Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
(Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit EURATOM München
(Leiter: Professor Dr. Thierfelder)

DIE WIRKUNG VON EISEN(II)-SULFAT AUF DIE ERYTHROPOESE IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Frank Werner
aus Kassel

1974

Aus der I. Inneren Abteilung des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln (Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Holldack)
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF, Assoziation mit EURATOM München (Leiter: Professor Dr. Thierfelder)

DIE WIRKUNG VON EISEN(II)-SULFAT AUF DIE ERYTHROPOESE IN VITRO

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Frank Werner
Kassel

Referent: Prof. Dr. I. Boll

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H.-J. Kirstaedter

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 11.2.1974

GLIEDERUNG

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Fragestellung	8
III.	Methode	9
IV.	Ergebnisse	17
V.	Diskussion	47
VI.	Zusammenfassung	55
VII.	Literaturverzeichnis	56

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546521_0084

I. EINLEITUNG

Eisen(II)-sulfat wird als einfaches und wirksames Mittel bei Eisenmangelzuständen zur oralen Therapie verwendet. Das Anion ist dabei von untergeordneter Bedeutung [16] und bleibt in folgendem unberücksichtigt.

Die Versuche in vitro erlauben die Untersuchung der Proliferation von menschlichem Knochenmark. Dabei besteht der Vorteil, daß die zu prüfende Substanz, das zweiwertige Eisen, in die direkte Umgebung der Zellen gebracht werden kann.

Innerhalb des Organismus ist das Eisen einem mehrfachen Wertigkeitswechsel unterworfen. Vor seinem Übergang in die Transportform, d.h. vor seiner Bindung an das Plasmaprotein Transferrin, liegt das Eisen sowohl nach der Resorption [12] als auch nach der Freisetzung aus der Speicherform Ferritin [12] zweiwertig vor. Der Zusatz von zweiwertigem Eisen zu der Knochenmarkkultur erscheint daher zur Einführung in den Eisenstoffwechsel in vitro geeignet. Sowohl in der Transport- als auch in der Speicherform ist das Eisen dreiwertig komplex gebunden.

Der physiologische Kreislauf des Eisens, welcher nur mit geringer Ausscheidung einhergeht, wenn keine Blutung vorliegt, kommt dem geschlossenen System der in vitro-Bedingungen entgegen.

Wesentliche Einzelvorgänge dieses Kreislaufs können im Knochenmark beobachtet werden:
Erythrozyten-Abbau nach Phagozytose durch Zellen des retikuloendothelialen Systems[5],
Speicherung des aus dem Hämoglobin freigesetzten Eisens in Form von Ferritin und Hämosiderin [4), 12],
Transport des Eisens in Form von Transferrin [12],

Verwertung des Eisens durch Aufnahme in die Erythrozyten-Vorstufen und Einbau in das Hämoglobinmolekül.

Über den Einbau von Eisen in die Erythrozyten-Vorstufen existieren zwei Vorstellungen:

1. Transferrin-Moleküle lagern sich an spezifische Rezeptoren der Zellmembran von Erythroblasten und Retikulozyten an. Dadurch erfolgt eine selektive Aufnahme von Transferrin-Eisen [12]. Ungeklärt bleiben bei diesem Vorgang folgende Fragen:
   - Welches ist der Mechanismus der Eisen-Entnahme aus dem Transferrin durch die Zellmembran?
   - Wie erfolgt der Weg in die Zelle?
   - Wann wird das dreiwertige Eisen reduziert?
   - Geht das Eisen vor seinem Einbau in das Hämoglobin eine andere organische Bindung ein?

   Dieser Übertritt von Transferrin-Eisen in Erythrozyten-Vorstufen ist charakterisiert durch:
   - Energiebedarf,
   - Unabhängigkeit von der Hämsynthese,
   - Irreversibilität [12].

2. Ferritin-Moleküle werden aus dem Zytoplasma von Retikulumzellen durch Mikropinozytose auf anliegende Erythroblasten übertragen. Dieser Vorgang wird als Rhopheozytose bezeichnet (BESSIS) [5]. Innerhalb der Erythroblasten dringen die Ferritin-Moleküle in Mitochondrien ein. Dort erfolgt eine Umwandlung in sehr viel kleinere Granula ("micelles" ferrugineuses), welche sich nach Zerplatzen des Mitochondriums im Zytoplasma verteilen [4]. Auch hier bleibt die Frage ungeklärt:
   - Wie geht der Übergang von den im Zytoplasma verteilten Granula zum zweiwertigen Häm-Eisen im einzelnen vor sich?

Der Einbau des zweiwertigen Eisens in den Protoporphyrin-Ring erfolgt unter der katalytischen Wirkung der Ferrochelatase innerhalb der Mitochondrien, der Zusammenschluß des Häms mit dem Globin im Zytoplasma [12].

Mit Hilfe von radioaktiver Markierung sind quantitative Aussagen über den Einbau von Eisen in die Erythrozyten-Vorstufen gemacht worden. Nach MYHRE nimmt in vitro die Eisenaufnahme von den unreifen in Richtung auf die reifen Vorstufen (eingeschlossen die Retikulozyten) ab. Dabei sind Proerythroblasten und basophile Erythroblasten zu einer Gruppe zusammengefaßt. Diese Gruppe zeigt die quantitativ stärkste Eisenaufnahme (3, 4· 10^{-9} Mikrogramm pro Zelle und Stunde) [19]. Auf die Proerythroblasten entfällt der geringere Anteil [22]. Keine meßbare Eisenaufnahme stellt MYHRE bei den reifen Erythrozyten und bei den nicht zur Erythropoese gehörenden Zellen fest.

Die Verwendung des aufgenommenen Eisens durch Erythroblasten und Retikulozyten zur Hämoglobinsynthese beträgt in vitro ca. 50 %. In vivo wird dagegen eine nahezu vollständige Verwertung beobachtet. Bei perniziöser Anämie ist dieser Anteil geringer [20].

Elektronenmikroskopisch enthalten alle Erythroblasten und die Mehrzahl der Retikulozyten sichtbares Eisen in Form von Ferritin-Molekülen [6]. Diese Ferritin-Moleküle liegen in den Proerythroblasten verstreut vor, bilden in den reiferen Erythroblasten größere Aggregate [22].

Zum histochemischen Nachweis dreiwertigen Eisens, welches durch HCl freigesetzt wird, dient die Berliner-Blau-Reaktion. Erythroblasten bzw. Erythrozyten, innerhalb derer mit dieser Methode nachgewiesene eisen(III)-haltige Partikel lichtmikroskopisch sichtbar werden, heißen Sideroblasten bzw. Siderozyten [2a]. Aufgrund des begrenzten Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops werden bei der

Berliner-Blau-Reaktion nur größere Aggregate aus eisen(III)-haltigen Partikeln sichtbar. In Abhängigkeit von der Verteilung können damit die beiden Speicherformen des Eisens, Ferritin und Hämosiderin, jedenfalls teilweise nachgewiesen werden.

Hämosiderin enthält Ferritin-Moleküle in geordneter Formation [4] und ist wahrscheinlich ein Kondensationsprodukt aus Ferritin und abgebauten Zellbestandteilen [12] (zerebrosidartige Lipoide und Mukopolysaccharide [1b]). Die Biosynthese von Ferritin wird durch Eisen-Gabe gesteigert [23], [12].

Bei Entzündungen (Tumoren) liegt eine Störung der Eisen-Freigabe aus der Speicherform vor. Es kommt bei einer Verminderung der Reutilisation von Eisen aus alternden Erythrozyten und unveränderter Utilisation des Transferrin-Eisens zu einer Erniedrigung der Plasma-Eisen-Konzentration [14]. Durch Eisen-Gabe wird kein wesentlicher therapeutischer Effekt erzielt [2b].

Bei normaler Plasma-Eisen-Konzentration und normaler Erythropoese beträgt der Anteil der Sideroblasten 20 - 40 % der Erythroblasten. Bei stärkerer Erhöhung der Plasma-Eisen-Konzentration kann er bis auf 70 % ansteigen. Der Anteil der Sideroblasten bei Eisenmangel-Anämie ist erniedrigt [2a]. Bei Hämoglobin-Synthesestörungen ist die Granulazahl oder -größe in den Sideroblasten erhöht, es kommt zum Auftreten von sog. Ringsideroblasten [22].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigen dieses Verhalten der Sideroblasten:
Bei Eisenmangel-Anämien ist nach Phagozytose und Digestion von Erythrozyten durch Retikulumzellen weder Hämosiderin noch Ferritin im Zytoplasma zu erkennen. Der Vorgang der Rhopheozytose bleibt erhalten ohne sichtbare Ferritin-Moleküle innerhalb der Erythroblastenvakuolen [5]. Bei Hämoglobin-Synthesestörungen liegt ei-

ne Vermehrung von Ferritin im Zytoplasma der Erythroblasten sowie eine Eisen-Anhäufung zwischen den Cristae der Mitochondrien vor [4].

Der Anteil der Siderozyten im Knochenmark ist stets höher als im peripheren Blut. Er beträgt peripher 0 - 0,3 % der Erythrozyten [22), 2a)], kann im Knochenmarkblut bei hyperplastischem Mark (hämolytische Anämie) bis zu 19 % ansteigen [7]. Erhöhtes Eisenangebot führt zu einer Zunahme des Siderozyten-Anteils im Knochenmark [7].

Die direkten Vorstufen der Erythrozyten nach Entkernung der Erythroblasten sind die Retikulozyten. Zytoplasma-Anteile der kernhaltigen Erythrozyten-Vorstufen stellen sich nach der Färbung mit Brillantkresylblau als Substantia granulofilamentosa dar. Diese besteht aus r-RNA und m-RNA. Retikulozyten enthalten Mitochondrien, welche annähernd gleichzeitig mit der RNA verschwinden (nach 1,5 - 4 Tagen) [22]. Vor dieser endgültigen Reifung erfolgt noch der Einbau von Eisen und die Synthese von Hämoglobin [19), 20)]. Bei gesteigerter Erythropoese kann es zu einer vorzeitigen Entkernung der Erythroblasten kommen, angefangen bei Erythroblasten der Kernklasse K 1/2. Zur Kernklasse K 1/2 gehört ein Teil der basophilen und polychromatischen Erythroblasten [22]. Retikulozyten können also entstehen, ohne daß die gesamten Vorstufen durchlaufen werden.

Im peripheren Blut nimmt bei gesteigerter Erythrozyten-Bildung sowohl die Anzahl der Retikulozyten als auch der Anteil der unreifen Formen (Erythrozyten mit Polychromasie) zu [1a)].

Bei der kombinierten Darstellung von Siderozyten und Retikulozyten aus peripherem Schweineblut sind - nach auf zweierlei Art experimentell erzeugtem Siderozytenanstieg - von DEISS u. Mitarb. folgende Beobachtungen gemacht worden [13]:

a) Bei einer Hämoglobin-Synthesestörung, hervorgerufen durch Pyridoxin-Mangel, liegen die siderophilen Granula (bestehend aus Nicht-Ferritin in Mitochondrien) hauptsächlich in Erythrozyten ohne Substantia granulofilamentosa. In vitro erfolgt kein Verschwinden der Granula.
b) Bei angeregter Erythropoese, hervorgerufen durch Aderlaß, liegen die siderophilen Granula (bestehend aus Ferritin-Aggregaten) hauptsächlich in Retikulozyten. In vitro erfolgt ein Verschwinden der Granula innerhalb von 72 h.

In Bezug auf siderophile Granula und Substantia granulofilamentosa besteht zwischen Schwein und Mensch folgender Unterschied [18]: Beim Schwein werden die siderophilen Granula schneller abgebaut als die Substantia granulofilamentosa, beim Menschen ist das Verhältnis umgekehrt.

Qualitativ kann also von diesen Tierversuchen auf den Menschen geschlossen werden. Ein Siderozytenanstieg wird demnach verursacht durch gestörte Eisenverwertung innerhalb der Erythrozyten-Vorstufen einerseits und durch Herabsetzung der zur Verwertung erforderlichen Zeit andererseits. Bei erhaltener Hämoglobin-Synthese ist die Speicherform in vitro mobilisierbar.

Die beschriebene Verwertung von Eisen durch die Erythrozyten-Vorstufen im Knochenmark ist verbunden mit einer Reifung dieser Vorstufen. Die Reifungsaktivität zusammen mit der Teilungsaktivität oder Regeneration geben Auskunft über die Proliferation der Erythropoese (BOLL).

Der teilungsfähige Anteil der Erythropoese umfaßt im Normalfall die unreifen Stufen (Proerythroblasten, basophile Erythroblasten, wenige polychromatische Erythroblasten) [11]. Bei angeregter Erythropoese durch Eisenmangel oder Hämolyse (auch bei Sideroachresie)

liegt eine Erweiterung dieses Anteils bis zu den orthochromatischen Erythroblasten vor. Es kommt dann zu einem erhöhten Ausstoß an Erythrozyten in Form von Mikrozyten [11]. Megaloblastenmark zeigt eine vermehrte Regeneration bei Kernreifungsstörung mit mangelhafter Zellverkleinerung. Die Regeneration der poly- und orthochromatischen Erythroblasten ist dabei am stärksten [11]. Infolge der Kernreifungsstörung bleibt jedoch hier die vermehrte Erythrozyten-Bildung aus.

II. FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit soll festgestellt werden, ob durch den Zusatz von zweiwertigem Eisen zu Knochenmarkkulturen eine Änderung der Proliferation der menschlichen Erythropoese erfolgt. Im Kulturmedium wird diejenige Konzentration des Eisens verwendet, die etwa der totalen Eisenbindungskapazität entspricht.

Dabei interessieren die Fragen, ob das Eisen in die Erythrozyten-Vorstufen aufgenommen wird, ob das aufgenommene Eisen weiter verarbeitet wird, ob eine Änderung der Reifungsaktivität erfolgt. Die Reifungsaktivität (erster Faktor der Proliferation) wird mit Hilfe von Differentialzählungen beurteilt.

Eine zusätzliche Aussage zu diesem Fragenkomplex soll gewonnen werden durch die spezielle Darstellung einerseits von Sideroblasten und Siderozyten, andererseits von Retikulozyten. Dabei soll geprüft werden, ob eine Beziehung zwischen Siderozyten und Retikulozyten hergestellt werden kann.

Die Frage nach einer Änderung des Regenerationsverhaltens wird mit Hilfe der Zählung und Differenzierung der Mitosen beantwortet. Die Regeneration oder Teilungsaktivität bildet den zweiten Faktor der Proliferation.

III. METHODE

Zur Beantwortung der gestellten Fragen wird von dem Knochenmarkpunktat jedes untersuchten Patienten eine Versuchsreihe angelegt. Ausgangspunkt für die Beurteilung der jeweiligen Versuchsreihe ist der Originalausstrich, welcher sofort nach der Knochenmarkpunktion angefertigt wird. Vom übrigen Punktionsmaterial werden parallele Kulturen angelegt, eine Kulturreihe ohne, eine zweite mit Zusatz von Eisen(II)-sulfat, welche nach 24, 48 und 72 Stunden ausgestrichen werden. Im Vergleich mit der Kontroll-Reihe sollen zusatzbedingte Veränderungen festgestellt werden.

Die Herstellung der Knochenmarkkulturen erfolgt nach einer Abwandlung der Deckglasmethode von CARELL [9]:

Auf einem Deckglas wird ein Koagulum hergestellt aus:
1 Tropfen Corhormon^{R} (Extrakt aus Schweine- und Kalbsembryonen mit standardisiertem Wirkstoffgehalt) dreifach verstärkt als Wuchsstoff,
5 Tropfen Eigenplasma (Blutentnahme 1 - 6 h vor der Knochenmarkpunktion) zum Koagulieren,
4 Tropfen Eigenserum (Kontroll-Reihe) bzw.
3 Tropfen Eigenserum + 1 Tropfen $FeSO_4$-Lösung in einer Konzentration von 40 Mikrogramm Fe(II) pro Milliliter 0,9 %-iger NaCl-Lösung (Zusatz-Reihe).
Damit ergibt sich in der Zusatz-Reihe eine Eisen(II)-Endkonzentration von 4 Mikrogramm pro Milliliter.

Auf dieses Koagulum wird ein nach der Punktion in Heparinlösung (3 Mikrogramm Heparin pro Milliliter Hank's Lösung) aufgefangenes Knochenmarkbröckchen gegeben und mit einem kleinen autologen Serum-Tröpfchen bedeckt. Danach erfolgt die luftdichte Abdekkung durch einen Hohlschliffobjektträger (3 mm Dicke). Nach Umdrehen des Objektträgers ist die Kultur im hängenden Tropfen entstanden.

Die auf diese Weise hergestellten Knochenmarkkulturen werden bei 37° C inkubiert und nach Ablauf der angegebenen Zeiten ausgestrichen, fixiert und gefärbt.

Die Färbung erfolgt:

a) nach Pappenheim allein,

b) nach Pappenheim kombiniert mit der Berliner-Blau-Reaktion[2a)],

c) nach einer im hämatologischen Labor des Städtischen Krankenhauses Neukölln entwickelten Methode zur Retikulozyten-Färbung:

Färbung:
Lufttrocknen des Ausstriches,
1 - 2 min fixieren in 70 %-igem Methanol,
20 min lufttrocknen (abdunsten des Methanols),
5 min färben,
abspülen mit Aqua dest.
Färbelösung:
Verdünnung 1 : 10 der Stammlösung mit Lösungsmittel.
Stammlösung (haltbar):
200 mg Brillantkresylblau in 100 ml Lösungsmittel.
Lösungsmittel:
12 g Saccharose in Aqua dest. vorgelöst,
10 ml 40 %-iger Formaldehyd,
pH mit verdünnter $NaHCO_3$-Lösung auf 7,2 einstellen,
mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen (Lösungsmittel frisch zubereiten wegen Oxydation des Formaldehyds und pH-Verschiebung).

Zur Auszählung und Differenzierung der Zellen wird ein monokulares Mikroskop der Firma Otto Seibert Wetzlar verwendet bei einer Tubuslänge von 170 mm, Ölimmersion, 105-facher Vergrößerung des Objektivs und numerischer Apertur von 1,30.

Die Auszählung erfolgt mäanderförmig vorwiegend im Bereich der hämatopoetische Zellen enthaltenden Randpartien.

Aus den Präparaten mit Pappenheim- sowie mit kombinierter Pappenheim-Berliner-Blau-Färbung werden jeweils 1000 - 2000 Zellen der gesamten Hämatopoese, aus denen mit Retikulozyten-Färbung jeweils 500 Zellen der roten Reihe einschließlich der darauf entfallenden Retikulozyten gezählt.

Es wird folgende Einteilung vorgenommen:

A. Pappenheim-Färbung:

rote Reihe [11]:

Proerythroblast (PE)	teilungsfähig
basophiler (bE)	
polychromatischer (pE)	
orthochromatischer (oE)	
reifer Erythroblast (rE)	nicht teilungsfähig

weiße Reihe [15], [10a]:

Myeloblast (Mb)	teilungsfähig
Promyelozyt (Pr)	
neutrophiler Myelozyt (Mz)	
eosinophiler Myelozyt – Metamyelozyt (Eos)	
basophiler Myelozyt (Bas)	
Promonozyt (Pm)	
neutrophiler Metamyelozyt (J)	
stabkerniger neutrophiler (St)	nicht teilungsfähig
segmentkerniger neutrophiler (Sg)	
eosinophiler (Eos)	
basophiler Granulozyt (Bas)	
Monozyt (Mo)	

Außerdem werden unterschieden:
große Retikulumzellen, kleine Retikulumzellen, phagozytierende Retikulumzellen, Plasmoblasten, Plasmazellen, Megakaryoblasten, Megakaryozyten, Lymphoblasten, Lymphozyten.

Die Mitosephasen werden nach folgenden Kriterien beurteilt [8), 11)]:

1. Prophase (P): festes Spirem, Auflockerung der Kernsubstanz nach Auflösung von Kernmembran und Nukleolen,
2. frühe Metaphase (fM): lockeres Spirem, Zerstreuung der Chromosomen über die Zelle,
3. späte Metaphase (sM): Monaster bzw. Aequatorialplatte je nach Betrachtungsebene, sternförmig doppelte Anordnung der Chromosomen,
4. Anaphase (A): Diaster, Auseinanderweichen der Chromosomenplatten in Richtung der Spindelpole,
5. Telophase (T): lockeres Dispirem, Einschnürung des Zytoplasmas,
6. Rekonstruktionsphase (R): festes Dispirem, zwei gleiche Tochterzellen, gelegentlich durch Plasmafaden verbunden, noch keine Ausbildung von Kernmembran und Nukleolen.

B. Berliner-Blau-Reaktion:

Gruppe I: zartkörnige Sideroblasten (-zyten),
Gruppe II: grobkörnige Sideroblasten (-zyten)und Ringsideroblasten. [22)]
Die Kombination der Berliner-Blau-Reaktion mit der Pappenheim-Färbung hat den Vorteil, die nachgewiesenen eisen(III)-haltigen Partikel den bekannten Reifungsstufen zuordnen zu können. Die Erkennung der basophilen Sideroblasten macht zunächst Schwierigkeiten, ist aber möglich aufgrund der grün-blauen Farbe der siderophilen Granula gegenüber der violett-blauen bzw. helleren Farbe des basophilen Zytoplasmas und aufgrund des räumlichen Verhaltens bei Betätigung der Mikrometerschraube.

Ein vorher angestellter Vergleich zwischen zwei Originalpräparaten des gleichen Patienten (3) - Berliner-Blau-Reaktion mit Pappenheim-Färbung und Berliner-Blau-Reaktion mit Kernechtrot-Gegenfärbung - fällt zugunsten der Pappenheimkombination aus. Die bei diesem Vorversuch differenzierte Zellzahl (rote Reihe + Siderozyten) beträgt im ersten Fall 479, im zweiten 502.

C. Retikulozyten-Färbung:

Gruppe a: unreife Retikulozyten (0, I, II),
Gruppe b: reife Retikulozyten (III, IV). [22)]
Neben der Unterscheidung der beiden Retikulozyten-Gruppen erfolgt die Bestimmung der Anzahl der Erythroblasten als Ganzes, da bereits vorher differenziert worden ist. Die Retikulozyten-Färbung ermöglicht zusätzlich eine vollständige Differenzierung der hämatopoetischen Zellen und Einteilung entsprechend der unter A. angegebenen.

Zur Beurteilung der Reifungs- und Teilungsaktivität (Regeneration) werden die aus der Zellzählung gewonnenen Ergebnisse folgendermaßen in Beziehung gesetzt und ausgewertet:

Reifung:

Reifungskurve:
Prozentualer Anteil der Reifungsstufen (additiv aufgetragen) von roter bzw. weißer Reihe (Bezugspunkt: Zellzahl der jeweiligen Reihe) (Ordinate) in Abhängigkeit von der Zeit (d. h. von den Kulturstunden) (Abszisse); diejenigen Reifungsstufen, deren relativer Anteil kleiner als 1 % ist, bleiben unberücksichtigt.

$\frac{G}{E}$ - Index ($\frac{G}{E}$ I) :

Verhältnis der Zellzahlen von weißer (G) zu roter Reihe (E).

Regeneration:

Mitose-Index (MI):
Verhältnis der Anzahl Mitosen zu der Zahl der teilungsfähigen Zellen innerhalb der roten (rMI) bzw. der weißen Reihe (wMI).
Karyologische Kurve:
prozentualer Anteil der Mitosen (Bezugspunkt: Summe aller Mitosen von roter bzw. weißer Reihe aus 24-, 48- und 72 h- Präparaten aller Patienten), welcher auf die einzelnen Mitose-Phasen entfällt.

Zur Beurteilung der Zellzahlen mit siderophilen Granula wird der prozentuale Anteil der gefundenen Sideroblasten und Siderozyten (Bezugspunkt: alle Erythroblasten + Siderozyten) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Entsprechend werden die gefundenen Retikulozyten mit den Erythroblasten zusammengefaßt und prozentual gegen die Zeit aufgetragen.

Die statistische Berechnung erfolgt mit Hilfe des χ^2 - Verfahrens[3]:

Die Formel zur Berechnung von χ^2 lautet:

$$\chi^2 = S \frac{(B - E)^2}{E}$$

S = Summe
B = Beobachtungswert
E = Erwartungswert

Eine Stichprobe setzt sich aus einer bestimmten Anzahl von Beobachtungswerten zusammen. Der Erwartungswert für den jeweiligen Beobachtungswert ist gleich dem Produkt aus vereinigter Stichprobe und Umfang derjenigen Stichprobe, aus welcher der bestimmte Beobachtungswert stammt. Die vereinigte Stichprobe ist gleich der Summe der zu vergleichenden Beobachtungswerte dividiert durch die Summe der Stichprobenumfänge, aus denen die Beobachtungswerte stammen.

Die Rechnung erfolgt mit Anzahlen, nicht mit prozentualen Häufigkeiten.

Damit kann das χ^2 für zwei benachbarte Kurvenpunkte (z. B. 24 und 48 h einer Zellart), für zwei parallele Kurvenpunkte (z. B. Kontrolle und Zusatz einer Zellart bei 24 h), aber auch für mehrere benachbarte und parallele Kurvenpunkte eines oder mehrerer Patienten gleichzeitig berechnet werden.

Ist ein Erwartungswert gleich oder kleiner als 5, fällt das χ^2 zu groß aus. Daher ist in diesen Fällen die Yates'sche Korrektur erforderlich:
Bei $B > E$ wird B um 0,5 erniedrigt,
bei $B < E$ wird B um 0,5 erhöht.
Dabei müssen die Randsummen erhalten bleiben. Die Randsummen entsprechen der vereinigten Stichprobe.

Der korrigierte Beobachtungswert wird dem normalen Rechengang unterworfen.

Für jedes berechnete χ^2 wird der zugehörige P-Wert aus von PAETAU [3] konstruierten graphischen Tafeln ermittelt. Zu berücksichtigen ist dabei die Anzahl der Freiheitsgrade (f):

$f = (G - 1)(K - 1)$

G = Anzahl der Gruppen
K = Anzahl der Klassen

Die Anzahl der Gruppen entspricht der Anzahl der Beobachtungswerte einer Stichprobe, die Anzahl der Klassen der Anzahl der zu vergleichenden Stichproben.

Der P-Wert (probability) gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, daß die verglichenen Zellanzahlen derselben Grundgesamtheit entstammen.

Ausgangspunkt für die Beurteilung des Unterschiedes zweier oder mehrerer verglichener Häufigkeiten ist die Nullhypothese. Diese besagt, daß der beobachtete Unterschied zufällig ist, und die verglichenen Zellanzahlen derselben Grundgesamtheit entstammen. Liegt ein niedriger P-Wert vor (z.B. P = 0,001), kann die Nullhypothese als widerlegt angesehen werden. Im angenommenen Beispiel trifft sie nur in einem von tausend Fällen zu, d.h. der beobachtete Unterschied ist signifikant (mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 ‰).

Für die Beurteilung von P gilt:
$P > 0,05$: der Unterschied ist zufallsbedingt,
$P = 0,05 - 0,01$: die Zugehörigkeit der verglichenen Zellanzahlen zu derselben Grundgesamtheit ist zweifelhaft,
$P < 0,01 - 0,0027$: } der Unterschied { (statistisch einigermaßen gesichert)
$P < 0,0027$: } ist signifikant { (statistisch gut gesichert).

Beim Vergleich mehrerer Häufigkeiten gleichzeitig und Berechnung eines einzigen χ^2 (z.B. Vergleich der gesamten roten Reihe nach 24 h zwischen Kontrolle und Zusatz) ist der Unterschied zwischen zwei darin enthaltenen einzelnen Häufigkeiten (z.B. basophilen Erythroblasten in Kontrolle und Zusatz nach 24 h) dann sicher signifikant, wenn die Summe von $\frac{(B - E)^2}{E}$ der beiden Einzelkomponenten gleich oder größer als 9 ist.

Der beobachtete Anstieg oder Abfall einer Kurve zwischen zwei Punkten ist statistisch gesehen dann zufallsbedingt, wenn der für den Unterschied zwischen den beiden Punkten ermittelte P-Wert größer als 0,05 ist. In diesem Fall muß ein horizontaler Verlauf der Kurve angenommen werden. Bei einem P-Wert von kleiner als 0,01 ist der Anstieg oder Abfall signifikant.

IV. ERGEBNISSE:

Es werden die Knochenmarkkulturen von vier Patienten untersucht. In allen Fällen wird die Pappenheim-Färbung angewandt, zusätzlich bei den Kulturen der Patienten 3 und 4 die Berliner-Blau-Reaktion, außerdem bei Patient 4 die Retikulozyten-Färbung. Die insgesamt ausgezählte und differenzierte Zellzahl beträgt 60 239.

1.) Patient G.M., geb. 7.10.28, Aufnahme-Nr. NK 5153/70.

Klinische Daten:
Nikotin-und Alkoholabusus
Diagnose: geringgradige Polyglobulie
Sternalpunktion: 25.5.70.
Medikamente zur Zeit der Punktion: keine
Blutbild (19.5.70.):

Hämatokrit	57 %
Hb	18,6 g %
Erythrozyten	$5,71 \cdot 10^6/\mu l$
Hb_E	32,7 pg
Retikulozyten	2 ‰
Leukozyten	8 300/µl
neutrophile segmentkernige Granulozyten	65 %
Lymphozyten	30 %
Monozyten	5 %
Thrombozyten	152 000/µl
Plasma-Eisen-Konzentration (26.5.70.):	170,4 µg/100 ml

Die Kultur mit $FeSO_4$-Zusatz zeigt im Vergleich mit der Kontrollkultur folgende Veränderungen:

Reifungskurven (Abb. 1):

Rote Reihe:

Nach 24 h: bE ↓, pE ↑, oE ↑, rE ↓

48 h: pE ↓, oE ↑

72 h: bE ↑

Die reiferen Erythroblasten nehmen zeitlich bis 48 h fortschreitend auf Kosten der unreiferen zu. Nach 72 h liegt eine Zunahme von unreifen Erythroblasten vor.

Weiße Reihe:

Im Laufe der Kultur: Mz ↑

$\frac{G}{E}$ I (Tab. 1):

Der $\frac{G}{E}$ - Index steigt nach 72 h an.

MI (Tab. 2):

Der Mitose-Index der roten Reihe bleibt unverändert, derjenige der weißen Reihe nimmt nach 24 und 72 h ab.

2.) Patientin R. B., geb. 3.1.13., Aufnahme-Nr. NK 9060/70

Klinische Daten:

Diagnose: Fettleber, hämolytische Anämie (zur Zeit der Punktion in Remission)

Sternalpunktion: 15. 9. 70.

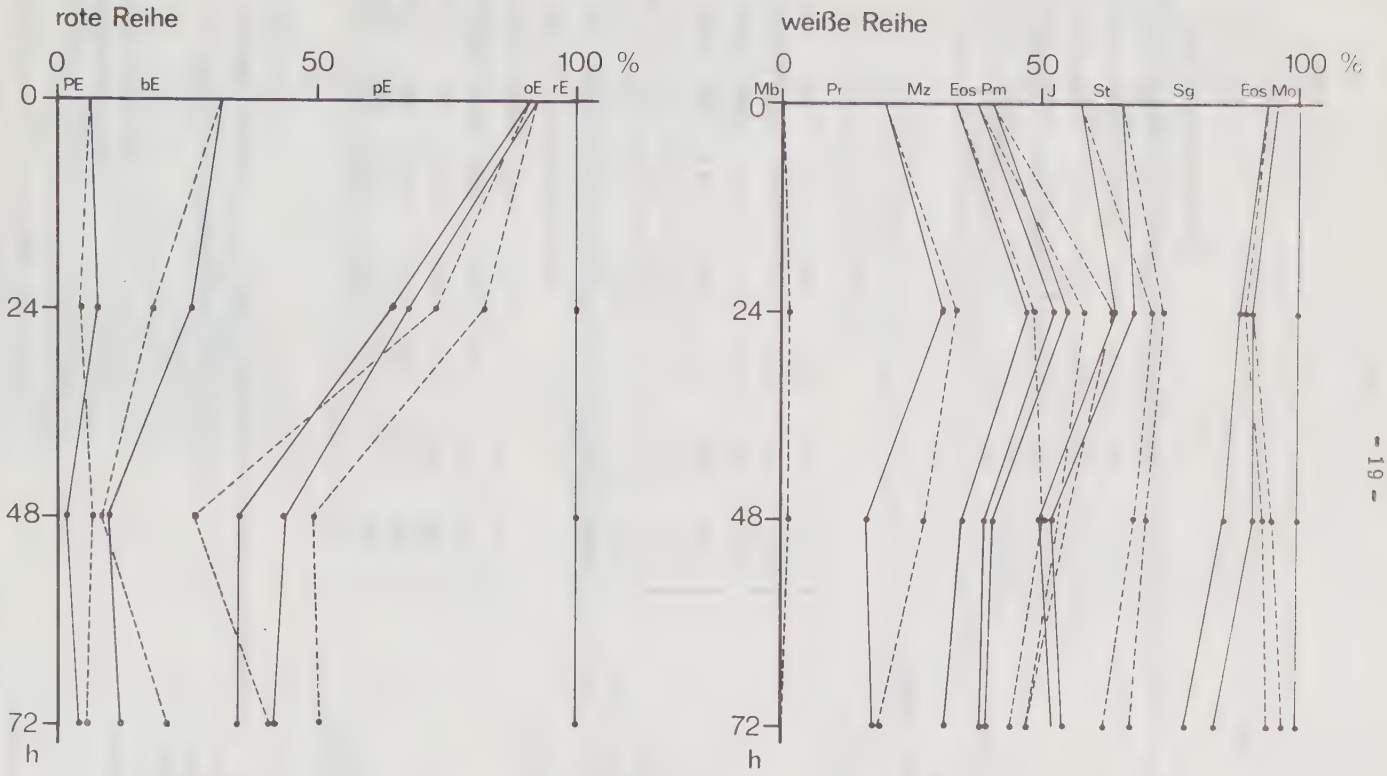
Medikamente zur Zeit der Punktion: keine

Blutbild:

(15. 9. 70.):

Hämatokrit	37 %
Hb	12,6 g %
Erythrozyten	$4{,}03 \cdot 10^6/\mu l$
Hb_E	31,0 pg
Retikulozyten	7 ‰

Fall 1: Reifungskurven



Erklärung siehe Text Seite 11, 13

Abb. 1

Tab. 1

$\frac{G}{E}$ – Indizes

Fall	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
1	2,77	2,40	2,53	8,26	4,40	8,31	23,50
2	3,31	2,37	5,84	15,30	14,10	23,40	9,18
3	3,22	3,31	2,00	5,30	5,39	3,65	21,60
4	2,03	1,46	1,01	2,11	0,96	4,32	6,39
Summe	2,75	2,25	2,38	5,11	3,28	6,18	11,60
(Mittelwert	2,83	2,39	2,86	7,74	6,21	9,92	15,17)

Tab. 2

Mitose – Indizes

rMI / °/oo:

1	7,35	14,80	14,40	12,60	12,40	0,00	0,00
2	28,70	17,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3*	6,97	7,49	12,20	4,14	17,40	5,69	27,80
4	24,10	14,99	4,72	15,50	0,00	9,90	20,00
Summe	17,30	13,60	9,23	9,40	7,19	5,96	15,10
(Mittelwert	16,78	13,75	7,83	8,06	7,45	3,90	12,00)
Summe 1, 2, 4	20,60	15,50	7,62	12,60	1,87	6,25	12,30
(Mittelwert	20,05	15,83	6,37	9,37	4,13	3,30	6,67)

wMI / °/oo:

1	8,50	12,80	5,40	6,72	8,05	12,20	5,71
2	9,30	9,22	2,42	0,00	2,19	2,40	4,65
3	6,80	8,80	3,11	4,78	8,76	10,45	0,00
4	7,31	2,93	6,96	12,90	9,25	8,85	2,97
Summe	7,99	8,60	4,24	6,38	7,25	7,91	3,55
(Mittelwert	7,98	8,44	4,47	6,10	7,06	8,48	3,33)

K = Kontrolle
Z = $FeSO_4$ - Zusatz
rMI = roter Mitose - Index
wMI = weißer Mitose - Index
0,00 = keine Mitosen
* = Megaloblastenmark
Summe = Neuberechnung von $\frac{G}{E}$ - und Mitose-Indizes nach Addition der entsprechenden Ausgangszahlen (siehe Text Seite 13, 14) aller Fälle
Mittelwert = arithmetisches Mittel der $\frac{G}{E}$ - bzw. Mitose-Indizes aller Fälle
Summe (Mittelwert) 1, 2, 4 = siehe Text Seite 38

(8.9.70.):

Leukozyten	7 000/µl
neutrophile stabkernige	2 %
neutrophile segmentkernige Granulozyten	54 %
Lymphozyten	38 %
Monozyten	4 %
atypische mononukleäre Zellen	2 %
Thrombozyten	194 000/µl
Plasma-Eisen-Konzentration (17.7.70.):	88µg/100 ml

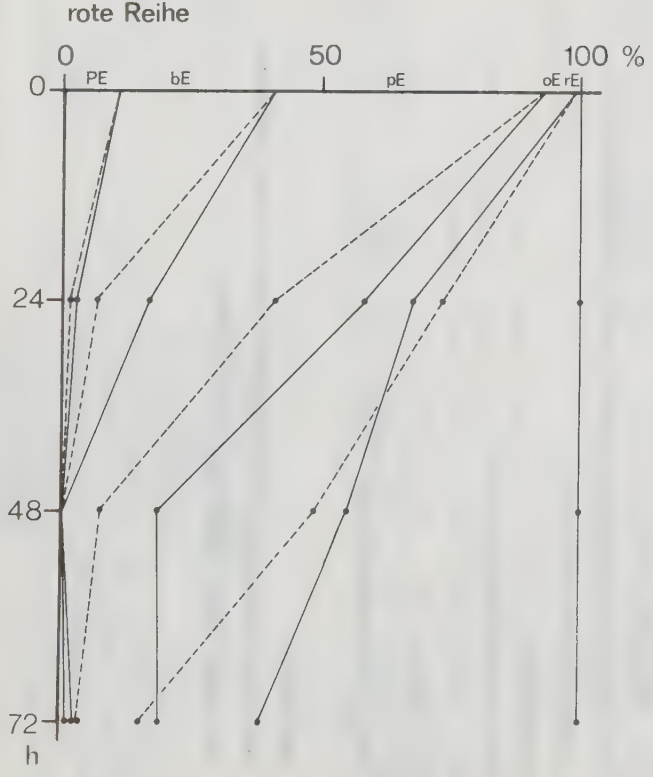
Die Kultur mit $FeSO_4$-Zusatz zeigt im Vergleich mit der Kontrollkultur folgende Veränderungen:

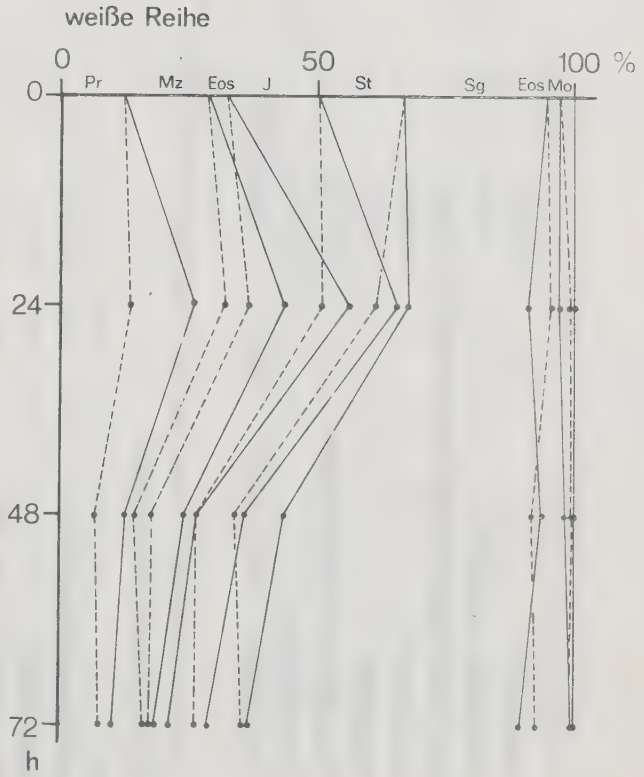
Reifungskurven (Abb. 2):
Rote Reihe:
Nach 24 h: bE ↓ , oE ↑
48 h: pE ↓ , rE ↑
72 h: pE ↓ , rE ↑
Die reiferen Erythroblasten nehmen zeitlich fortschreitend auf Kosten der unreiferen zu.
Weiße Reihe:
Nach 24 und 48 h: Pr ↓ , Sg ↑

$\frac{G}{E}$ I (Tab. 1):
Der $\frac{G}{E}$ - Index nimmt nach 72 h ab.

MI(Tab. 2):
Der Mitose-Index der roten Reihe nimmt nach 24 h ab, derjenige der weißen Reihe verhält sich entsprechend.

Fall 2: Reifungskurven





Kontrolle

$FeSO_4$

Erklärung siehe Text Seite 11, 13

Abb. 2

3.) Patientin H. L., geb. 12. 7. 95. Aufnahme-Nr. NK 2991/71

Klinische Daten:

Diagnose : perniziöse Anämie

Sternalpunktion: 31. 3. 71.

Medikamente zur Zeit der Punktion: Mixtura Pepsini (DRF)
Lanicor^{R}
Vibramycin^{R}
Furadantin^{R}

Blutbild:	
(30. 3. 71.):	
Hb	10,1 g %
Erythrozyten	2,72 · 10^6/µl
Hb_E	37,2 pg
Retikulozyten	8 ‰
(20. 3. 71.):	
Leukozyten	11 700/µl
eosinophile	2 %
neutrophile segmentkernige Granulozyten	60 %
Lymphozyten	36 %
Monozyten	2 %
Plasma-Eisen-Konzentration (30. 3. 71.):	34,1 µg/100 ml

Die Kultur mit $FeSO_4$-Zusatz zeigt im Vergleich mit der Kontrollkultur folgende Veränderungen:

Reifungskurven (Abb. 3):

Rote Reihe:

Es liegt keine wesentliche Veränderung vor.

Weiße Reihe:

Nach 72 h: Mz↑, J↓

$\frac{G}{E}$ I(Tab. 1):

Der $\frac{G}{E}$ - Index steigt nach 72 h an.

MI(Tab. 2):

Der Mitose-Index der roten Reihe steigt nach 24, 48 und 72 h an, derjenige der weißen Reihe nimmt nach 24 und 72 h ab.

Berliner-Blau-Reaktion (Tab. 3, Abb. 4):
Der Anteil der Sideroblasten nimmt nach 24 und 48 h mäßig zu. Der Anteil der Siderozyten nimmt nach 48 und 72 h zu.
Gruppe I und II der Sideroblasten und Siderozyten verhalten sich einzeln entsprechend ihrer Summe.
Nach Zuordnung der Sideroblasten zu den einzelnen Reifungsstufen ergeben sich die in Tabelle 4 zusammengefaßten Werte: Die Zunahme beginnt bei den polychromatischen Erythroblasten.

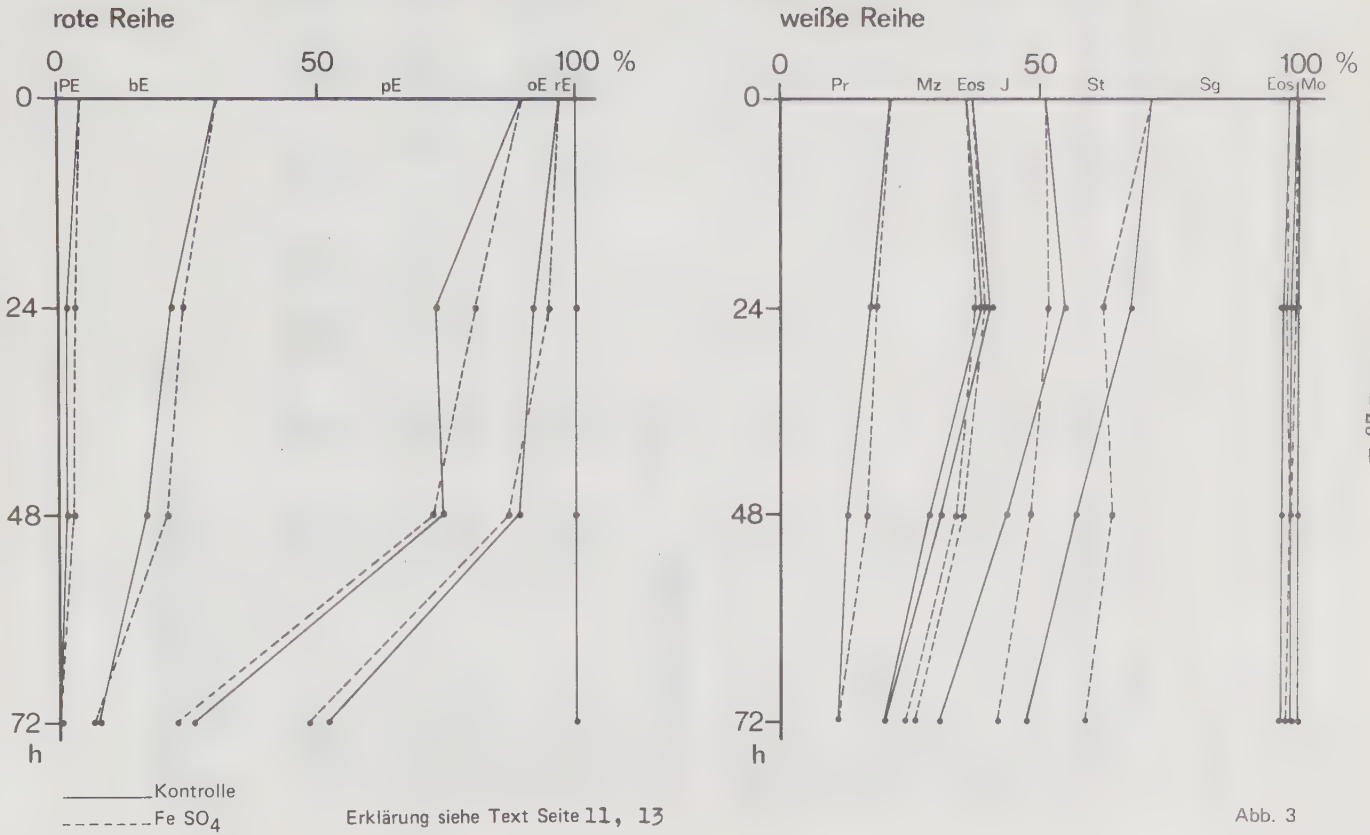
4.) Patientin M. M., geb. 5.1.1900, Aufnahme-Nr. NK 4573/71

Klinische Daten:
Diagnose: Anämie bei chronischer Pyelonephritis
Sternalpunktion: 24.5.71.
Medikamente zur Zeit der Punktion: Bellergal^{R}
Novodigal^{R}
Furadantin retard^{R}

Blutbild (10.5.71):

Hb	9,7 g %
Erythrozyten	$3{,}38 \cdot 10^{6}/\mu l$
Hb_E	28,8 pg
Leukozyten	7 800/µl
eosinophile	8 %
neutrophile stabkernige	7 %
neutrophile segmentkernige Granulozyten	58 %

Fall 3: Reifungskurven



Erklärung siehe Text Seite 11, 13

Abb. 3

Tab. 3

Fall 3 (perniziöse Anämie): Berliner – Blau – Reaktion

Zellzahl:

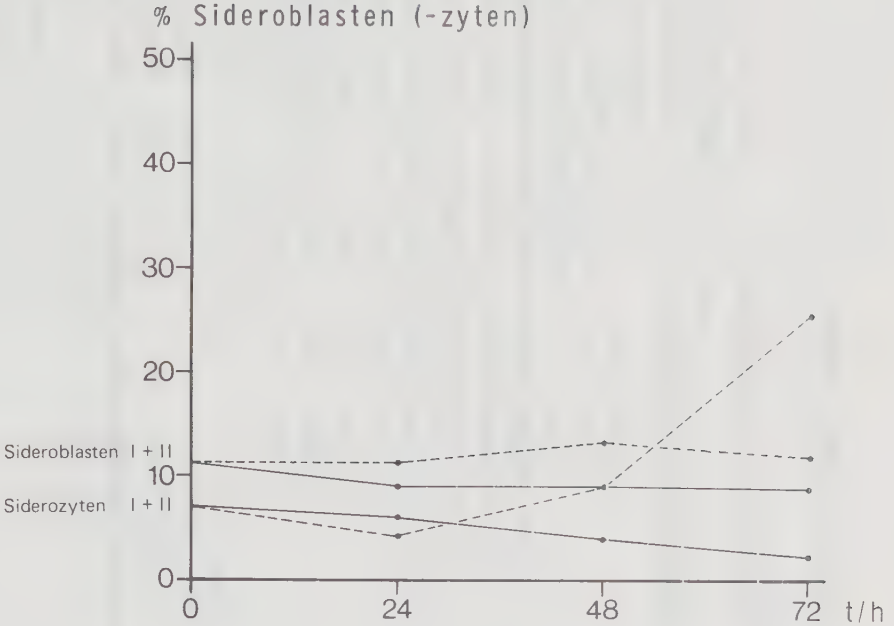
	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
rote Reihe + Siderozyten	479	465	634	315	291	350	101
Gruppe I:							
Sideroblasten	52	41	66	27	36	29	12
Siderozyten	33	27	25	12	16	8	22
Summe	85	68	91	39	52	37	34
Gruppe II:							
Sideroblasten	2	2	6	2	3	2	0
Siderozyten	1	1	2	1	10	0	4
Summe	3	3	8	3	13	2	4
Gruppe I + II:							
Sideroblasten	54	43	72	29	39	31	12
Siderozyten	34	28	27	13	26	8	26
Summe	88	71	99	42	65	39	38

% Sideroblasten (–zyten):
(Bezugspunkt: Erythroblasten + Siderozyten)

Gruppe I:							
Sideroblasten	10,85	8,80	10,40	8,57	12,37	8,29	11,90
Siderozyten	6,89	5,80	3,93	3,81	5,50	2,28	21,76
Summe	17,74	14,60	14,33	12,38	17,87	10,57	33,66
Gruppe II:							
Sideroblasten	0,42	0,43	0,95	0,64	1,03	0,57	0,00
Siderozyten	0,21	0,22	0,32	0,32	3,44	0,00	3,96
Summe	0,63	0,65	1,27	0,96	4,47	0,57	3,96
Gruppe I + II							
Sideroblasten	11,27	9,23	11,35	9,21	13,40	8,86	11,90
Siderozyten	7,10	6,02	4,25	4,13	8,94	2,28	25,72
Summe	18,37	15,25	15,60	13,34	22,34	11,14	37,62

K = Kontrolle
Z = $FeSO_4$ – Zusatz
Gruppe I: zartkörnige Sideroblasten (–zyten)
Gruppe II: grobkörnige Sideroblasten (–zyten)

Fall 3: Berliner – Blau – Reaktion



Erklärung siehe Text Seite 12, 14

Abb 4

Tab. 4

Fall 3 und 4: Berliner – Blau – Reaktion

% Sideroblasten (I + II):
(Bezugspunkt: Zellzahl der jeweiligen Reifungsstufe)

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
Fall 3							
PE	11,10	16,60	10,50	0,00	0,00	0,00	––
bE	12,80	11,40	11,00	11,90	6,25	17,40	0,00
pE	9,85	7,15	9,30	9,61	13,99	6,25	8,33
oE	18,80	9,63	23,00	12,50	25,60	11,40	26,30
rE	35,70	22,20	12,50	12,90	20,00	7,83	15,40
Fall 4							
PE	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	––	––
bE	4,18	7,21	27,30	0,00	9,09	0,00	0,00
pE	5,74	6,20	14,40	13,30	18,10	38,90	50,00
oE	22,20	13,00	15,00	14,70	19,00	30,30	0,00
rE	50,00	5,10	8,83	17,20	22,30	30,90	36,40

K = Kontrolle
Z = $FeSO_4$ – Zusatz
0,00 = keine Sideroblasten
–– = keine Zellen der Reifungsstufe

Abkürzungen siehe Text Seite 11, 12

Lymphozyten	24 %
Monozyten	3 %
Anisozytose	+
Poikilozytose	+
polychromatische Erythrozyten	+
Plasma-Eisen-Konzentration (14. 5. 71.):	42,6 µg/100 ml

Die Kultur mit $FeSO_4$-Zusatz zeigt im Vergleich mit der Kontrollkultur folgende Veränderungen:
(Anm.: Die Werte für die 72 h -Kultur der Zusatz-Reihe werden zweimal bestimmt:
1. aus der Pappenheim-Färbung,
2. aus der Retikulozyten-Färbung,
weil die Zellzahl im ersten Fall sehr klein ist. Das Ergebnis ist prinzipiell gleich. Zur Beurteilung von Reifungskurven, $\frac{G}{E}$ I, MI nach 72 h werden die Zahlen aus der Retikulozyten-Färbung herangezogen, da sie besser gesichert sind (Gesamtzellzahl: 2273, rote Reihe: 224).)

Reifungskurven (Abb. 5):
Rote Reihe:
Nach 24 h: bE↓, pE↓, oE↑, rE↑
48 h: pE↑, oE↓
72 h: pE↑, rE↓
Die reiferen Erythroblasten nehmen nach 24 h auf Kosten der unreiferen zu. Nach 48 und 72 h liegt eine Zunahme von unreifen Erythroblasten vor.
Weiße Reihe:
Nach 72 h: Pr↓, Mz↑, J↑

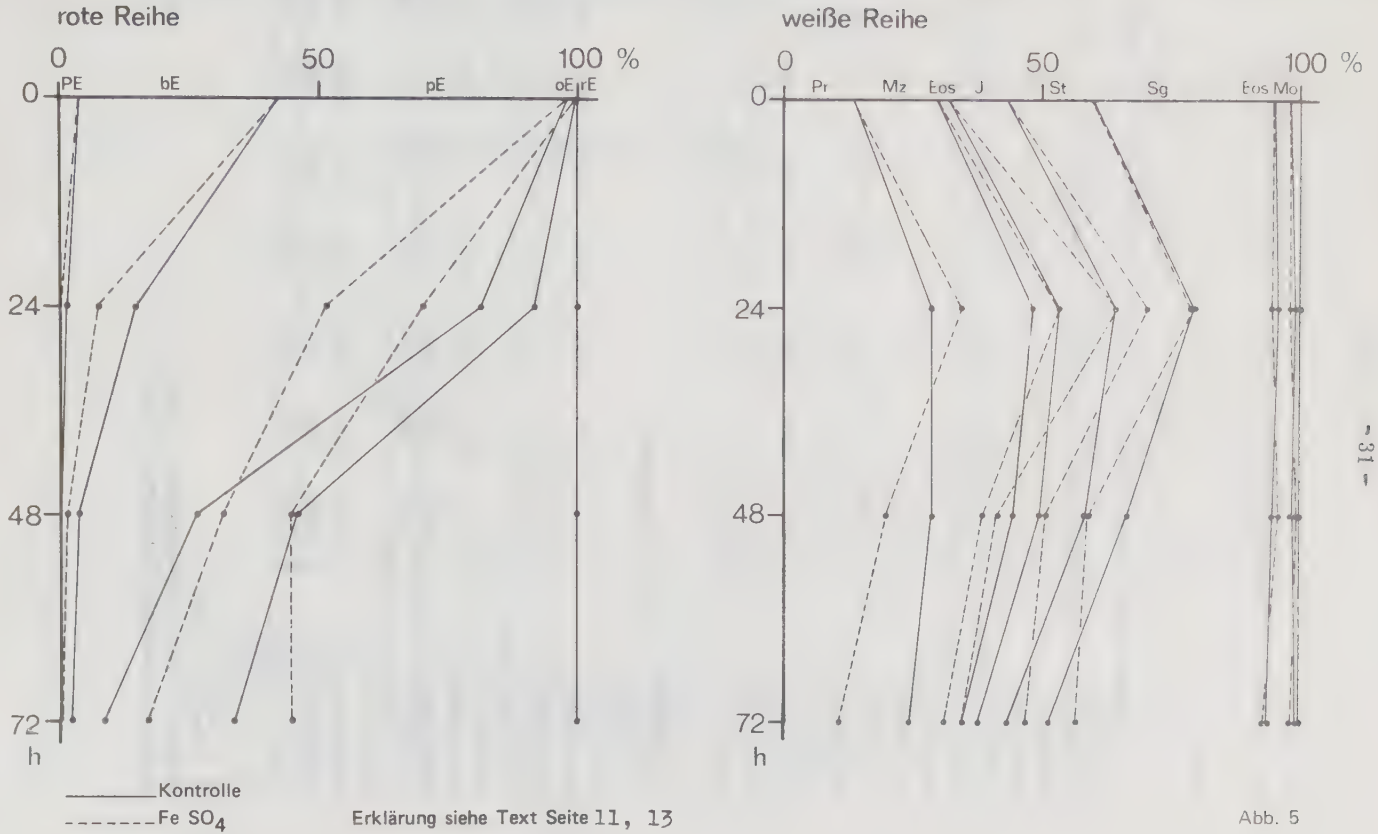
$\frac{G}{E}$ I (Tab. 1):
Der $\frac{G}{E}$ - Index ist im Laufe der Kultur nicht wesentlich verändert.

MI(Tab. 2):
Der Mitose - Index der roten Reihe nimmt nach 24 und 48 h ab, nach 72 h zu, derjenige der weißen Reihe nimmt nach 72 h ab.

Berliner-Blau-Reaktion (Tab. 5, Abb. 6):
Der Anteil der Sideroblasten nimmt nach 24 und 48 h zu, nach 72 h ab.
Der Anteil der Siderozyten nimmt nach 72 h zu.
Gruppe I und II der Sideroblasten und Siderozyten verhalten sich einzeln entsprechend ihrer Summe.
Nach Zuordnung der Sideroblasten zu den einzelnen Reifungsstufen ergeben sich die in Tabelle 4 zusammengefaßten Werte: Die Zunahme nach 24 und 48 h betrifft alle Reifungsstufen mit Ausnahme der Proerythroblasten.

Retikulozyten-Färbung (Tab. 6, Abb. 7):
(Anm.: Die 48 h-Kultur der Zusatz-Reihe ergibt kein auswertbares Präparat, daher werden die Punkte zwischen 24 und 72 h direkt verbunden.)
Der Anteil der Retikulozyten nimmt nach 24 h ab, nach 72 h zu.
Zu Beginn der Kultur liegen mehr reife Retikulozyten als unreife, nach 72 h mehr unreife Retikulozyten als reife vor.

Fall 4: Reifungskurven



Erklärung siehe Text Seite 11, 13

Abb. 5

Tab. 5

Fall 4 (Anämie bei chronischer Pyelonephritis): Berliner – Blau – Reaktion

Zellzahl:

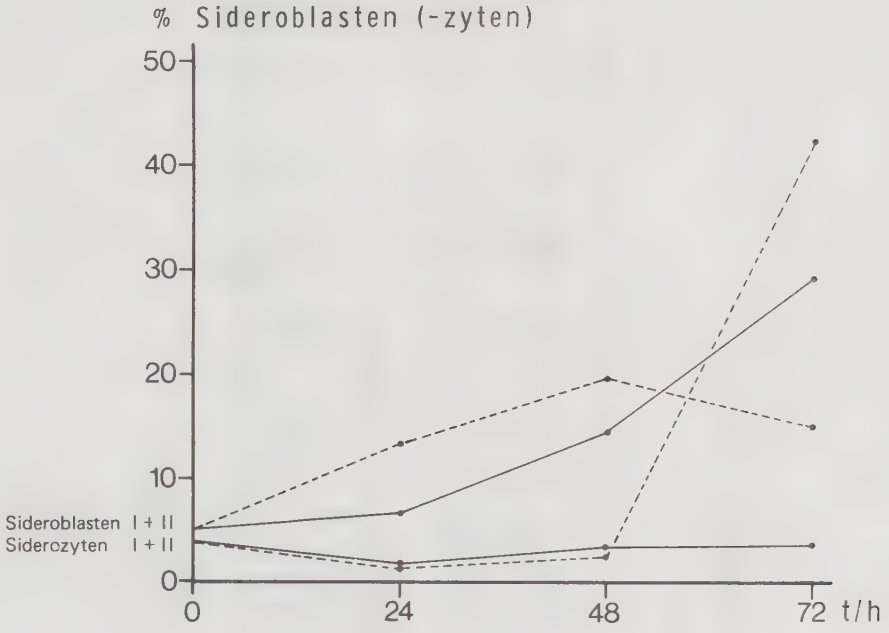
	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
rote Reihe + Siderozyten	649	741	613	588	912	314	33
Gruppe I:							
Sideroblasten	32	44	68	82	156	61	4
Siderozyten	14	11	7	20	19	7	12
Summe	46	55	75	102	175	68	16
Gruppe II:							
Sideroblasten	1	6	15	4	25	31	1
Siderozyten	11	2	2	1	4	5	2
Summe	12	8	17	5	29	36	3
Gruppe I + II:							
Sideroblasten	33	50	83	86	181	92	5
Siderozyten	25	13	9	21	23	12	14
Summe	58	63	92	107	204	104	19

% Sideroblasten (–zyten):
(Bezugspunkt: rote Reihe + Siderozyten)

Gruppe I:							
Sideroblasten	4,94	5,93	11,09	13,95	17,09	19,42	12,12
Siderozyten	2,16	1,48	1,14	3,40	2,08	2,23	36,38
Summe	7,10	7,41	12,23	17,35	19,17	21,65	48,50
Gruppe II:							
Sideroblasten	0,15	0,81	2,44	0,68	2,74	9,88	3,03
Siderozyten	1,69	0,27	0,33	0,17	0,44	1,59	6,06
Summe	1,84	1,08	2,77	0,85	3,18	11,47	9,09
Gruppe I + II							
Sideroblasten	5,09	6,74	13,53	14,63	19,83	29,30	15,15
Siderozyten	3,85	1,75	1,47	3,57	2,52	3,82	42,44
Summe	8,94	8,49	15,00	18,20	22,35	33,12	57,59

K = Kontrolle
Z = $FeSO_4$ – Zusatz
Gruppe I: zartkörnige Sideroblasten (–zyten)
Gruppe II: grobkörnige Sideroblasten (–zyten)

Fall 4: Berliner – Blau – Reaktion



Erklärung siehe Text Seite 12, 14

Abb. 6

Tab. 6

Fall 4: Retikulozyten — Färbung

Zellzahl:

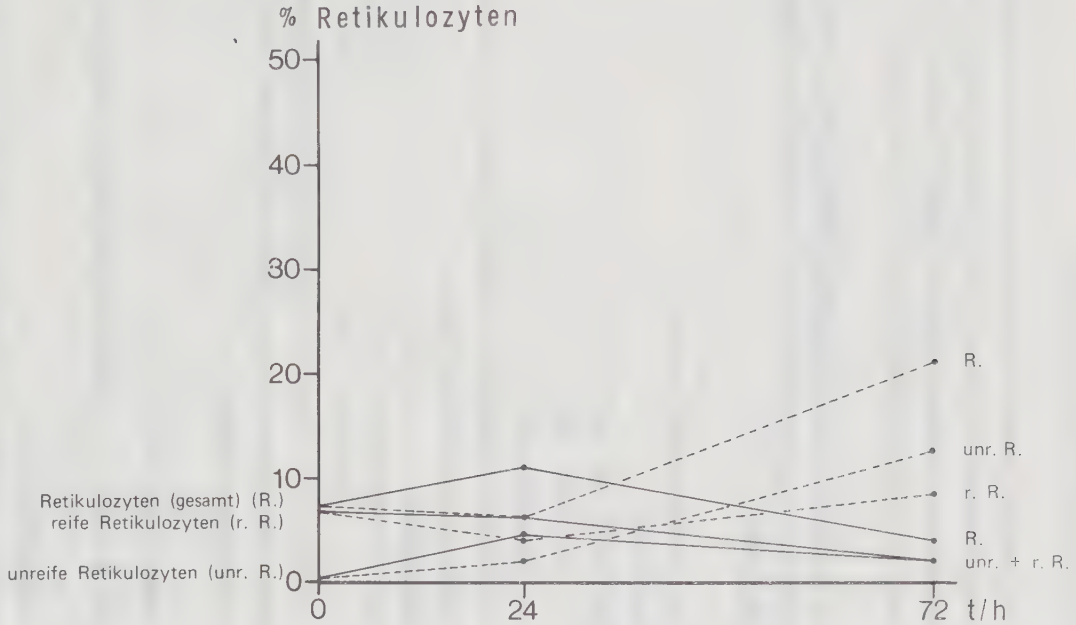
	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
rote Reihe + Retikulozyten	503	512	508	504	——	504	511
unreife Retikulozyten	2	24	11	58	——	10	64
reife Retikulozyten	35	33	21	30	——	10	44
gesamte Retikulozyten	37	57	32	88	——	20	108

% Retikulozyten:
(Bezugspunkt: rote Reihe + Retikulozyten)

unreife Retikulozyten	0,40	4,68	2,17	11,45	——	1,98	12,55
reife Retikulozyten	6,94	6,42	4,13	5,95	——	1,98	8,60
gesamte Retikulozyten	7,34	11,10	6,30	17,40	——	3,96	21,15

K = Kontrolle
Z = $FeSO_4$ — Zusatz
—— = keine zählbaren Zellen

Fall 4: Retikulozyten – Färbung



Erklärung siehe Text Seite 13, 14

Abb

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Zur Übersicht werden Gesamtwerte gewonnen durch Addition der entsprechenden Originalzahlen aller Fälle und Neuberechnung von prozentualen Anteilen und Indizes. Diese Werte weichen vom arithmetischen Mittel der prozentualen Anteile und Indizes ab.

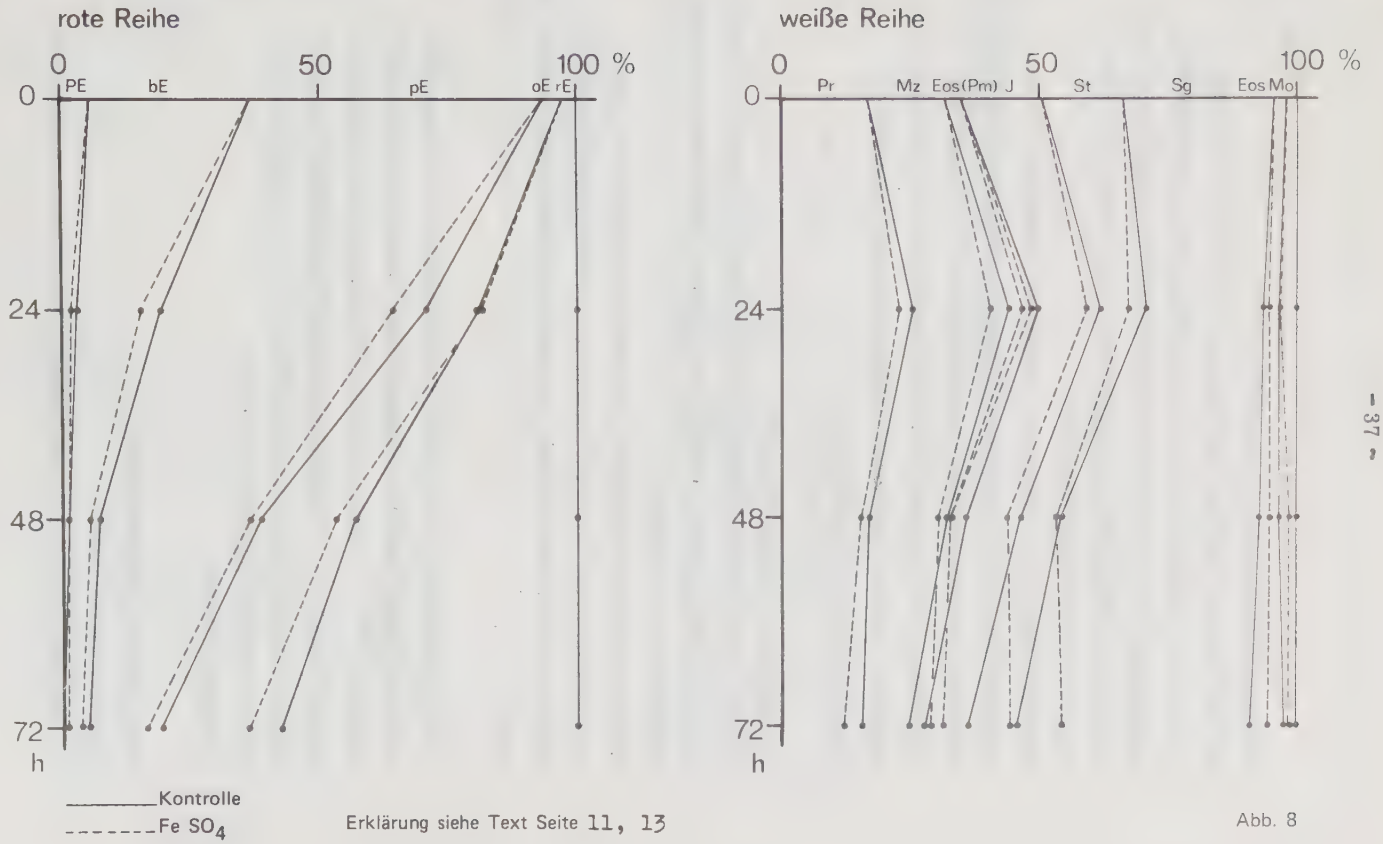
Die Gesamtwerte aller Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz zeigen im Vergleich mit den Gesamtwerten aller Kontrollkulturen folgende Veränderungen:

Gesamt-Reifungskurven (Abb. 8):
Rote Reihe:
Nach 24 h: bE ↓ , oE ↑
48 h: bE ↓ , rE ↑
72 h: bE ↓ , rE ↑
Die reiferen Erythroblasten nehmen im Laufe der Kulturzeit auf Kosten der unreiferen gering zu.
Weiße Reihe:
Nach 24 und 48 h: Pr ↓ , Sg ↑
72 h: Mz ↑ , J ↑
Nach 24 und 48 h nehmen die reifen Zellen der Granulopoese auf Kosten der unreifen gering zu, nach 72 h steigt der Anteil von unreifen Zellen mäßig an.

Gesamt - $\frac{G}{E}$ I (Tab. 1):
Der Gesamt - $\frac{G}{E}$ - Index nimmt nach 48 h ab, steigt nach 72 h an.

Gesamt-MI (Tab. 2):
Der Gesamt-Mitose-Index der roten Reihe nimmt nach 24 und 48 h ab, steigt nach 72 h an, derjenige der weißen Reihe nimmt nach 24 und 72 h ab.

Summe aller 4 Fälle: Reifungskurven



Erklärung siehe Text Seite 11, 13

Abb. 8

Aufgliederung des roten Gesamt-MI:
Zur Prüfung, ob innerhalb der Summe aller Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz eine Verschiebung des teilungsfähigen Anteils der Erythropoese gegenüber der Summe der Kontrollkulturen erfolgt, wird der rote Gesamt-Mitose-Index aufgegliedert, d. h. den einzelnen Reifungsstufen zugeordnet (Tab. 7):
Nach 24 h liegt eine Erweiterung des teilungsfähigen Anteils der Erythropoese auf die orthochromatischen Erythroblasten vor. Die Zunahme des roten Gesamt-Mitose-Index nach 72 h kommt ausschließlich durch Mitosen der orthochromatischen Erythroblasten zustande, während der Gesamt-Mitose-Index der basophilen Erythroblasten nach 48 h überwiegt.

Karyologische Kurven (Abb. 9):
Soweit bei den geringen Mitosezahlen zu beurteilen, besteht zwischen Kontrolle und Zusatz weder in der roten noch in der weißen Reihe ein wesentlicher Unterschied.
Absolut werden zur Darstellung der karyologischen Kurven (siehe S. 14) sowohl in der roten als auch in der weißen Reihe weniger Mitosen in den Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz als in den Kontrollkulturen gezählt.

Der Originalausstrich von Fall 3 unterscheidet sich von allen anderen durch seinen Gehalt an Megaloblasten. Aufgrund früherer Ergebnisse [10b), 11)], nach denen diese Fälle eine Sonderstellung einnehmen, werden die Reifungskurven und Mitose-Indizes der roten Reihe sowie die $\frac{G}{E}$ - Indizes der Fälle 1, 2 und 4 noch einmal gesondert zusammengefaßt (Abb. 10):
Auffallende Punkte:

Reifungskurve der roten Reihe:
Nach 24 h: bE ↓ , oE ↑
Im Vergleich zu Abb. 8 ist die Zunahme der orthochromatischen auf

Tab. 7

Aufgliederung des roten Gesamt – Mitose – Index
(Bezugspunkt: gesamte Zellzahl der jeweiligen Reifungsstufe)

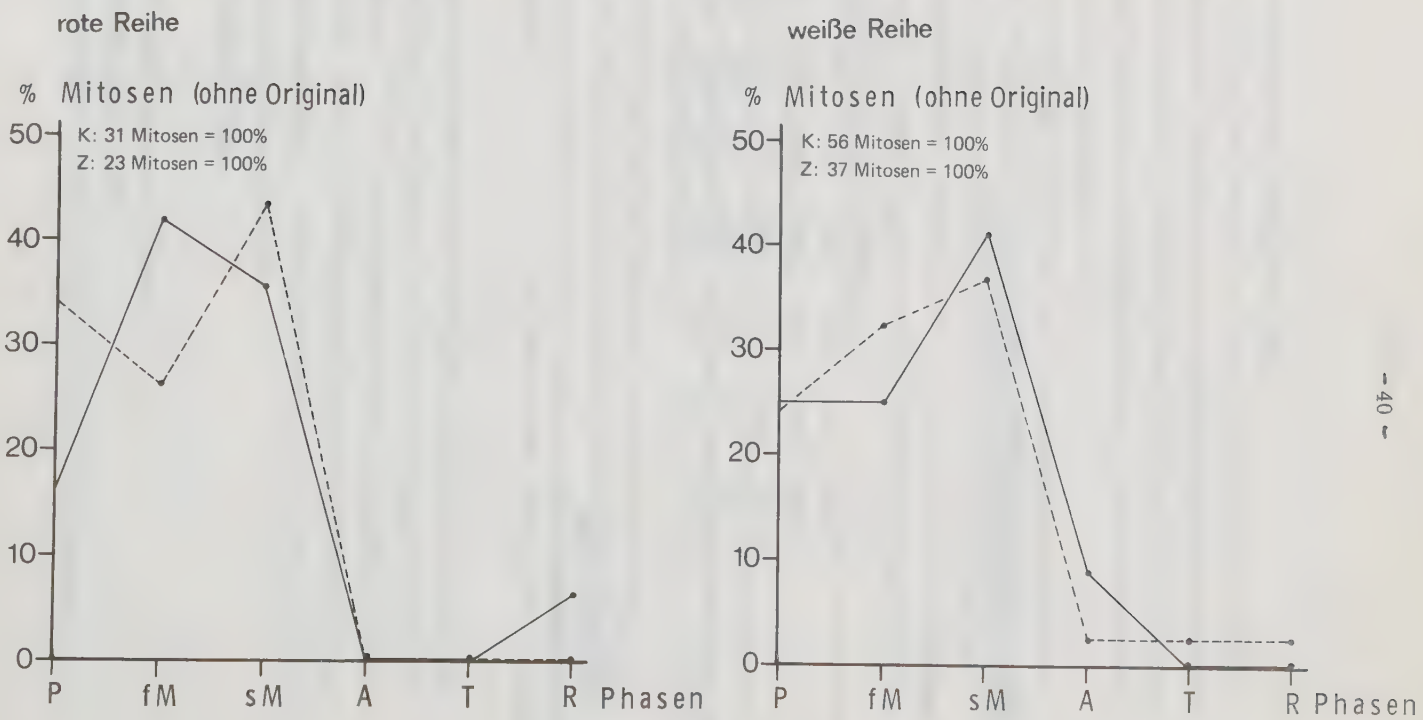
rMI / °/oo:

	0 h	24 h		48 h		72 h	
		K	Z	K	Z	K	Z
PE	26,80	15,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
bE	25,60	17,99	15,60	0,00	32,20	0,00	0,00
pE	13,00	14,90	10,20	11,50	4,55	0,00	0,00
oE	0,00	0,00	2,96	9,70	4,10	10,90	27,50
Gesamt – MI	17,30	13,60	9,23	9,40	7,19	5,96	15,10

K = Kontrolle
Z = $FeSO_4$ – Zusatz
rMI = roter Mitose – Index
0,00 = keine Mitosen

Abkürzungen der Reifungsstufen: siehe Text Seite 11

Karyologische Kurven



Kontrolle (K)

Fe SO_4 (Z)

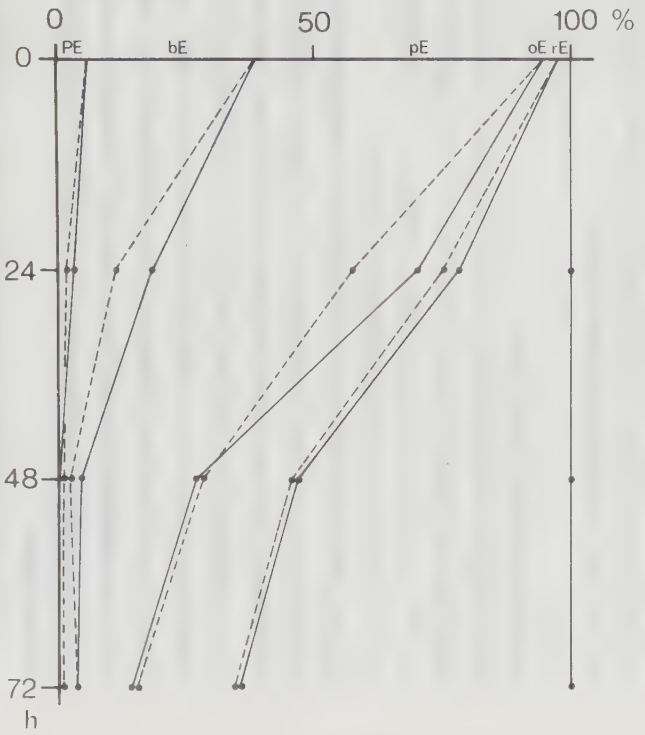
Erklärung siehe Text Seite 12, 14

Abb. 9

Summe der Fälle 1,2,4:

Reifungskurve

rote Reihe



Kontrolle (K)

Fe SO_4 (Z)

rote Mitose-Indizes

rMI/ ‰

K	Z
20,60	
15,50	7,62
12,60	1,87
6,25	12,30

$\frac{G}{E}$-Indizes

$\frac{G}{E}$I

K	Z
2,60	
1,98	2,53
5,07	2,83
8,08	10,00

Erklärung siehe Text Seite 11, 13, 14

Abb. 10

Kosten der basophilen Erythroblasten nach 24 h deutlicher ausgeprägt.

MI der roten Reihe:
Im Vergleich zu dem Gesamt-Mitose-Index der roten Reihe aller Fälle (Tab. 2) liegt eine stärkere Abnahme des gesamten roten Mitose-Index der Fälle 1, 2 und 4 nach 24 und 48 h vor. Im Gegensatz dazu steigt der Mitose-Index der roten Reihe beim Megaloblastenmark (Fall 3) nach 24 , 48 und 72 h an.

Sigifikanz der Ergebnisse:

Die Zusammenfassung von Ergebnissen verschiedener Patienten ist statistisch gesehen nur zulässig, wenn das Material homogen ist. Homogenität liegt dann vor, wenn der P-Wert für die verglichenen Zellanzahlen der verschiedenen Stichproben größer als 0,05 ist, d.h. die Nullhypothese bestätigt wird.

Reifungskurven der roten Reihe:
Der Vergleich der roten Reihe aus dem jeweiligen Originalpräparat zwischen den Fällen 1, 2 und 4 ergibt einen P-Wert von kleiner als 10^{-10}. Die statistische Beurteilung in Bezug auf die Reifungskurven der roten Reihe muß also getrennt erfolgen.
Zwischen Kontrolle und Zusatz der einzelnen Reifungskurven ergeben sich die in Tabelle 8 dargestellten signifikanten Unterschiede:
Die Zunahme der orthochromatischen unter gleichzeitiger Abnahme der basophilen Erythroblasten nach 24 h ist übereinstimmend bei den Fällen 1, 2 und 4 (normale Erythropoese) signifikant. In diesem Punkt besteht Übereinstimmung mit der Reifungskurve in Abb. 10.
Die Reifungskurve der roten Reihe von Fall 3 (Megaloblastenmark) zeigt durchgehend zwischen Kontrolle und Zusatz keine signifikanten Unterschiede.
Die übrigen signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Reifungskur-

Tab. 8

Signifikante Unterschiede:
Reifungskurven rote Reihe (Kontrolle – Zusatz)

Fall		24 h	48 h	72 h
1	↑	pE, oE	oE	
	↓	rE		
2	↑	oE		
	↓	bE		pE
3	↑			
	↓			
4	↑	oE, rE	pE	pE
	↓	bE, pE	oE	

↑ = Anstieg
↓ = Abfall
der Zellart in der Zusatz – Reihe gegenüber der Kontrolle

Abkürzungen siehe Text Seite 11

ven der roten Reihe zwischen den Kontrollkulturen der einzelnen Patienten und den Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz verhalten sich gegensinnig zueinander bzw. treten isoliert auf.

Mitosen der roten Reihe:
Beim rechnerischen Vergleich der Mitosen der roten Reihe, welcher insgesamt zwischen allen Patienten, allen Zeiten mit Ausnahme der Originalpräparate, Kontrolle und Zusatz angestellt wird, ergibt sich ein P-Wert von 0,98. Damit sind sämtliche beobachtete Unterschiede nicht signifikant. Das Material ist in Bezug auf die Mitosen der roten Reihe homogen.

Sideroblasten (-zyten) (Fall 3 und 4, Abb. 4 und 6):
Die statistische Prüfung des Verlaufs der Kurven von Sideroblasten bzw. Siderozyten ergibt (Tab. 9):
Die Kontrollkurven beider Fälle von Sideroblasten und Siderozyten verlaufen im Prinzip horizontal mit Ausnahme der Kontrollkurve der Sideroblasten von Fall 4. Der Anstieg zwischen 24 h - 48 h und 48 h - 72 h dieser Kurve ist signifikant (statistisch gut gesichert).
Die Sideroblastenkurve nach $FeSO_4$-Zusatz von Fall 4 steigt zwischen 0 und 48 h signifikant an, verläuft zwischen 48 und 72 h statistisch gesehen horizontal.
Die Verlaufsprüfung der Siderozytenkurve ($FeSO_4$-Zusatz) von Fall 4 sowie der Sideroblasten- und Siderozytenkurve ($FeSO_4$-Zusatz) von Fall 3 erübrigt sich aufgrund der nachfolgenden Berechnung der Unterschiede zwischen Zusatz- und Kontrollkulturen.
Zwischen Zusatz- und Kontrollkulturen sind folgende Unterschiede signifikant:
Fall 3 (perniziöse Anämie):
Nach 72 h: Siderozyten ↑ ($P < 10^{-10}$)
Fall 4 (Anämie bei chronischer Pyelonephritis):
Nach 24 h: Sideroblasten ↑ ($P = 3 \cdot 10^{-5}$)
48 h: Sideroblasten ↑ ($P = 0,0098$)
72 h: Siderozyten ↑ ($P < 10^{-10}$)

Tab. 9

Kurvenverlauf (Unterschied zwischen benachbarten Punkten):

Fall	Kurve	0 h – 24 h	24 h – 48 h	48 h – 72 h
3	Sb K	P = 0,3	P = 0,985	P = 0,88
	Sz K	P = 0,5	P = 0,24	P = 0,18
4	Sb K	P = 0,2	$P = 2{,}5 \cdot 10^{-6}$	$P = 1{,}5 \cdot 10^{-7}$
	Sz K	P = 0,017	P = 0,037	P = 0,84
	Sb Z	$P = 2 \cdot 10^{-7}$	P = 0,0015	P = 0,5

Sb K = Sideroblasten I + II Kontrolle
Sz K = Siderozyten I + II Kontrolle
Sb Z = Sideroblasten I + II Zusatz

Beiden Fällen gemeinsam ist der signifikante Anstieg der Siderozyten nach 72 h bei stetiger Kontrolle.
Der Anstieg der Sideroblasten von Fall 4 nach 24 h ist statistisch gut, nach 48 h nur mehr einigermaßen gesichert. Alle nicht erwähnten Unterschiede sind nicht signifikant.

Retikulozyten (Fall 4, Abb. 7):
Zwischen Zusatz- und Kontrollkulturen ergibt sich in Bezug auf die Signifikanz der beobachteten Unterschiede:

Nach 24 h: unreife Retikulozyten: $P = 0{,}027$
reife Retikulozyten: $P = 0{,}10$
gesamte Retikulozyten: $P = 0{,}006$
72 h: unreife Retikulozyten: $P = 10^{-10}$
reife Retikulozyten: $P = 2{,}6 \cdot 10^{-6}$
gesamte Retikulozyten: $P < 10^{-10}$

Nur die Zunahme der Retikulozyten nach 72 h (sowohl in den Einzelgruppen als auch insgesamt) ist statistisch gut gesichert.

V. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden mit Ergebnissen der Literatur verglichen und die aus diesem Vergleich ableitbaren Wirkungen des zweiwertigen Eisens auf die menschliche Erythropoese diskutiert. Die Diskussion führt zu der Beantwortung der in Kapitel II gestellten Fragen.

Frage 1:

Wird das den Knochenmarkkulturen zugesetzte Eisen, dessen Konzentration etwa der totalen Eisenbindungskapazität des Plasmas entspricht (4 Mikrogramm pro Milliliter), in die Erythrozyten-Vorstufen aufgenommen? Wird das aufgenommene Eisen zu Hämoglobin verarbeitet? Liegt eine Änderung der Reifungsaktivität der erythropoetischen Zellen vor?

Zur Beantwortung dieses Fragenkomplexes werden zunächst die Ergebnisse der Reifungskurven sowie das Verhalten von Sideroblasten, Siderozyten und Retikulozyten herangezogen:
Die Kulturen der Patienten mit normaler Erythropoese (Fall 1, 2, 4) zeigen nach 24 h eine Reifungsförderung. Diese Folgerung wird belegt durch die Zunahme der reiferen auf Kosten der unreiferen Erythroblasten zu diesem Zeitpunkt sowohl in den Einzel- (Abb. 1, 2, 5) als auch in den Gesamt-Reifungskurven (Abb. 8, 10) der roten Reihe sowie durch die Signifikanz-Berechnung für die Reifungskurven der roten Reihe (Tab. 8).
Reifungsförderung bedeutet in diesem Falle, daß durch den Zusatz von zweiwertigem Eisen zu der Knochenmarkkultur im Vergleich mit der Kontrolle - unter gleichzeitiger Kondensierung des Kernes - beschleunigt Eisen verwertet, d.h. in die Erythrozyten-Vorstufen aufgenommen und zu färberisch nachweisbarem Hämoglobin verarbeitet wird. Das setzt eine vorangehende Umwandlung des zugesetzten Eisens in Transferrin [12] oder Ferritin [5] mit Wertigkeitswechsel voraus.

Der zusatzbedingte beschleunigte Einbau von Eisen in die Erythrozyten-Vorstufen wird an der signifikanten Zunahme der Sideroblasten von Fall 4 nach 24 h sichtbar. Die relative Abnahme der Sideroblasten nach 72 h (Tab. 5, Abb. 6, siehe auch Verlaufsprüfung Tab. 9) entspricht einer Zunahme der Siderozyten und kommt durch beschleunigte Entkernung infolge der Reifungsförderung zustande. Infolge der Unabhängigkeit des Eiseneinbaues von der Hämsynthese einerseits und seiner Irreversibilität andererseits (Transferrin-Mechanismus) [20), 12)] wird die beschleunigte Aufnahme von Eisen in die Erythrozyten-Vorstufen durch die Berliner-Blau-Reaktion sichtbar. Die bekannte Tatsache der Vermehrung der Sideroblasten bei Erhöhung des Eisenangebots [2a)] wird bestätigt. Ob diese Vermehrung auf einer verstärkten Biosynthese von Ferritin [23), 12)] innerhalb der Erythrozyten-Vorstufen beruht, kann mit der gegebenen Methode nicht entschieden werden.

Der verstärkte Eiseneinbau mit Reifungsförderung erfolgt in der Knochenmarkkultur der Patientin mit Anämie bei chronischer Pyelonephritis (Fall 4). Die Folgen der durch die Entzündung bedingten erniedrigten Plasma-Eisen-Konzentration [14)] von 42 µg/100 ml werden also in vitro durch den Eisenzusatz von 400 µg/100 ml schnell und wirksam behoben. In vivo kann bei Entzündungen durch Eisengabe keine wesentliche therapeutische Wirkung auf die Anämie erzielt werden [2b)]. In unserem Modell wird aufgezeigt, daß die Erythropoese nicht primär geschädigt ist, und die Eisenaufnahme durch die Erythrozyten-Vorstufen ungehindert erfolgt. FREIREICH und Mitarb. beobachten dementsprechend in Tierversuchen eine unveränderte Utilisation von transferringebundenem Eisen bei Entzündungen [14)].

Eine Hämoglobin-Synthesestörung als Ursache des beobachteten Sideroblastenanstiegs nach 24 und 48 h ist unwahrscheinlich, da gleichzeitig eine Reifungsförderung vorliegt und keine Verschiebung zur

Gruppe der grobkörnigen Sideroblasten erfolgt [22].

An den bisher besprochenen Eiseneinbau schließt sich im weiteren Verlauf der Utilisation des den Knochenmarkkulturen zugesetzten Eisens die Verarbeitung des von den Erythrozyten-Vorstufen aufgenommenen Eisens zu Hämoglobin an. Diese Verarbeitung erfolgt langsamer als der Einbau in die Zellen [20]. Andernfalls wäre bei der Berliner-Blau-Reaktion keine Zunahme der eisenpositiven Erythrozyten-Vorstufen zu beobachten. Daß aber eine solche Verarbeitung vorliegt, beweist die Reifungsförderung (nachgewiesen durch die Reifungskurven) bei den Fällen mit normaler Erythropoese (1, 2, 4).

Die Feststellung der Reifungsförderung der erythropoetischen Zellen (normopoetische Kulturen 1, 2, 4) beruht nicht nur auf den Ergebnissen der Reifungskurven und dem Verhalten der Sideroblasten, sondern auch auf dem Verhalten von Siderozyten und Retikulozyten.

Der signifikante Siderozytenanstieg nach 72 h bei normaler Erythropoese (Fall 4, Abb. 6) kommt durch Entkernung der Sideroblasten aufgrund der Reifungsförderung zustande. Die Beobachtung von BILGER [7] wird bestätigt, daß bei erhöhtem Eisenangebot der Anteil der Siderozyten im Knochenmark zunimmt. Die Auswertung der Kulturen von Patient 4 ermöglicht die gleichzeitige Beurteilung von Reifungskurven, Berliner-Blau-Reaktion und Retikulozyten-Färbung bei ein und demselben Knochenmark. Das Verhalten der Retikulozyten (Abb. 7) läßt sich ebenso wie das der Sideroblasten und Siderozyten mit der Reifungsförderung aufgrund der Differentialzählung korrelieren. Nach 24 h kommt es zu einer beschleunigten Ausreifung der Retikulozyten, während die reifungsgeförderten Erythroblasten noch nicht zur Entkernung gelangt sind. Der Anstieg der Retikulozytenzahl nach 72 h, wobei die unreifen Formen das Übergewicht erhalten, ergänzt die Reifungskurve der roten Reihe

(Abb. 5): Die Verminderung der reifen Erythroblasten kommt durch Entkernung zu Retikulozyten zustande.

Die signifikante Zunahme sowohl der Retikulozyten als auch der Siderozyten nach 72 h macht wahrscheinlich, daß Substantia granulofilamentosa und siderophile Granula überwiegend gleichzeitig innerhalb der Erythrozyten vorkommen, ein weiterer Hinweis für eine zusatzbedingte Anregung der Erythropoese im Sinne einer Reifungsförderung [13]. Die weitere Ausreifung mit dem Verschwinden von Substantia granulofilamentosa und siderophilen Granula kommt aus zeitlichen Gründen (Ende der Kultur) nicht zustande.

Die Kultur des Patienten mit perniziöser Anämie (Fall 3) zeigt nach Reifungskurve und Signifikanzberechnung keine Reifungsförderung der erythropoetischen Zellen durch den Eisenzusatz (Abb. 3, Tab. 8). Das Verhalten der Sideroblasten von Fall 3 (Tab. 3, Abb. 4) entspricht in geringerem Maße dem von Fall 4 (Tab. 5, Abb. 6). Daraus wird geschlossen, daß trotz fehlender Reifungsförderung ein beschleunigter Einbau von Eisen in die Megaloblasten erfolgt. Aufgrund des Fehlens der Reifungsförderung wird dabei die Unabhängigkeit der Eisenaufnahme von der Hämsynthese bestätigt [12]. Die nicht erkennbare Verarbeitung des vermehrt aufgenommenen Eisens zu Hämoglobin entspricht der Tatsache, daß schon in vivo bei perniziöser Anämie die Eisenverwertung herabgesetzt ist [20]. Der signifikante Siderozytenanstieg nach 72 h (Abb. 4) bei fehlender Reifungsförderung im Megaloblastenmark führt zu der Frage: Wie kommt das gleiche Verhalten der Siderozyten einmal mit (Fall 4), einmal ohne Reifungsförderung (Fall 3) durch den Eisenzusatz zustande? Möglicherweise erfolgt die Siderozytenzunahme im Fall der normalen Erythropoese trotz vermehrter Hämoglobinsynthese aufgrund der beschleunigten Entkernung der Sideroblasten, im Fall der perniziösen Anämie wegen nicht vermehrter Hämoglobinsynthese bei verstärktem Eiseneinbau. In beiden Fällen reicht einerseits die gegebe-

ne Zeit zur Elimination der siderophilen Granula durch Verwertung zu Hämoglobin nicht aus, entfällt andererseits die Milz zur Elimination von Siderozyten im geschlossenen System der Knochenmarkkultur.

Das bisher entsprechend den Beobachtungen von BOLL [10b), 11)] festgestellte gegensätzliche Verhalten von normopoetischen und megaloblastischer Knochenmarkkultur in Bezug auf die Reifungskurven regt zum Vergleich mit den Ergebnissen von KNEIFEL [17)] an, der das Verhalten von Sideroblasten und Siderozyten mit gleicher Kulturtechnik bei verschiedenen Krankheitsbildern prüft. KNEIFEL beobachtet ein gegensätzliches Verhalten der Fälle von perniziöser Anämie gegenüber anderen Anämien: im Laufe der Kultur nehmen bei perniziöser Anämie die Sideroblasten ab, die Siderozyten wenig zu; bei anderen Anämien nehmen die Sideroblasten und Siderozyten zu.

In der vorliegenden Arbeit werden durchgehend die Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz mit den entsprechenden Kontrollkulturen verglichen. Zum folgenden Vergleich mit den Ergebnissen von KNEIFEL werden ausschließlich die Kontrollkurven der Sideroblasten und Siderozyten (Abb. 4, 6, Tab. 9) herangezogen: In Bezug auf die Sideroblasten läßt sich eine Gemeinsamkeit feststellen: im Laufe der Kultur nehmen im Fall der perniziösen Anämie die Sideroblasten im Gegensatz zur normalen Erythropoese nicht zu, während sich das Verhalten der Siderozyten unterscheidet: im Laufe der Kultur bleiben die Siderozyten bei der perniziösen Anämie und bei der normalen Erythropoese gleich.

Frage 2:

Liegt eine Änderung der Teilungsaktivität der erythropoetischen Zellen vor?

Die Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz der Patienten mit normaler Erythropoese (Fall 1, 2 , 4) zeigen gegenüber den Kontrollkulturen nach 24 h eine Abnahme des roten Mitose-Index (Tab. 2), was einer Regenerationsverminderung entspricht. Im Gegensatz dazu zeigt das Megaloblastenmark (Fall 3) nach 24, 48 und 72 h eine Regenerationsförderung in der Kultur mit $FeSO_4$-Zusatz. Die Reifungsförderung wird durch die megaloblastische Kernreifungsstörung blockiert. Dadurch kommt es möglicherweise zur Erhöhung der Teilungsaktivität.

Nach Aufgliederung des roten Gesamt-Mitose-Index auf die einzelnen Reifungsstufen (Tab. 7) wird nach 24 und 72 h eine Erweiterung des teilungsfähigen Anteils der Erythropoese auf die orthochromatischen Erythroblasten festgestellt. Das steht im Gegensatz zu der Beobachtung, daß bei Eisenmangel-Anämie mehr Mitosen in dieser Reifungsstufe vorkommen [11]. Möglicherweise ist dabei nicht der Eisenmangel, sondern die Anregung der Erythropoese von entscheidender Bedeutung, denn auch bei Hämolyse ist der teilungsfähige Anteil der Erythropoese erweitert. Nach 72 h werden allerdings nur noch bei 2 Versuchen (Fall 3 und 4) Mitosen gefunden. Die Beziehung zum Megaloblastenmark [11] (Fall 3) macht die Zunahme der Mitosen der orthochromatischen Erythroblasten nach 72 h zum Teil verständlich. Offen bleibt die Frage nach der Ursache für die isolierte Regenerationsförderung nach 72 h bei Fall 4.

Die karyologische Kurve der roten Reihe (Abb. 9) zeigt keine wesentliche zusatzbedingte Änderung in der Verteilung der einzelnen Mitosephasen. Es kommt also durch den Eisenzusatz zu keiner Mitosehemmung in einer bestimmten Phase.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit richtet sich auf die Erythropoese. Die Granulopoese ist dabei insofern von Bedeutung, als durch den $\frac{G}{E}$ - Index eine Verbindung zwischen roter und weißer Rei-

he hergestellt wird. Zur übersichtsmäßigen Beurteilung der Wirkung von Eisen (II)-sulfat auf die Granulopoese werden die Gesamtwerte aus allen 4 Versuchen unter dem Gesichtspunkt betrachtet, ob

a) eine Änderung der Reifung,

b) eine Änderung der Regeneration in den Kulturen mit $FeSO_4$-Zusatz gegenüber den Kontrollkulturen erfolgt.

Reifung:

Die Gesamt-Reifungskurve der weißen Reihe (Abb. 8) zeigt nach 24 und 48 h eine geringe Reifungsförderung (Zunahme der reifen auf Kosten der unreifen Zellen der Granulopoese). RINGELHANN stellt nach der Therapie von Fällen mit Eisenmangel-Anämien beim Aufhören des Eisenmangels eine Zunahme der Leukozyten in der Peripherie fest [21]. Erhöhtes Eisenangebot führt also auch in unserem Modell zu einer wenn auch geringen Reifungsförderung der Granulopoese. Nach 72 h wird eine mäßige Reifungshemmung sichtbar (Zunahme von unreifen Zellen).
Der Gesamt - $\frac{G}{E}$ - Index (Tab. 1) spiegelt nach 48 h die Reifungsförderung der weißen Reihe wider (bei schnellem Zugrundegehen der segmentkernigen Granulozyten). Nach 72 h wird die Reifungsförderung in der roten Reihe (Entkernung der Erythroblasten) sowie die Reifungshemmung in der weißen Reihe sichtbar. Beide Wirkungsrichtungen lassen den $\frac{G}{E}$ - Index ansteigen.

Regeneration:

Der Gesamt-Mitose-Index der weißen Reihe (Tab. 2) zeigt eine Verminderung der Teilungsaktivität nach 24 und 72 h. Regenerationshemmung verbunden mit Reifungsförderung findet sich nach 24 h sowohl in der roten als auch (weniger) in der weißen Reihe.
Die karyologische Kurve der weißen Reihe (Abb. 9) macht keine Hemmung in einer bestimmten Mitosephase sichtbar.

Die Wirkung von Eisen(II)-sulfat auf die Granulopoese ist insgesamt quantitativ gering ausgeprägt.

Unter Berücksichtigung der statistischen Berechnung wird aus der Diskussion der Ergebnisse die Folgerung gezogen:
Der Zusatz von zweiwertigem Eisen bewirkt bei allen geprüften Knochenmarkkulturen einen verstärkten Einbau von dreiwertigem Eisen in die Erythrozyten-Vorstufen. Mit Ausnahme des Megaloblastenmarks erfolgt eine Verwertung des verstärkt eingebauten Eisens, welche sich in einer beschleunigten Reifung äußert. An dieser Änderung der Proliferation der Erythropoese hat die Regeneration keinen wesentlichen Anteil.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung von Eisen(II)-sulfat auf die menschliche Erythropoese wird mit Hilfe von Knochenmark-Koagulumkulturen in vitro geprüft.

Der Zusatz zweiwertigen Eisens in einer Konzentration von 4 Mikrogramm pro Milliliter bewirkt nach einer Kulturzeit von 24 Stunden bei den 3 normopoetischen Knochenmarkkulturen eine Vermehrung der orthochromatischen unter gleichzeitiger Verminderung der basophilen Erythroblasten. Diese Wirkung zeigt sich nicht an der megaloblastischen Knochenmarkkultur. Nach 24 Stunden nimmt die Zahl der Sideroblasten bei der normopoetischen Kultur durch die Wirkung von Eisen(II)-sulfat zu. Nach 72 Stunden bewirkt der Zusatz von Eisen(II)-sulfat eine Vermehrung sowohl der Siderozyten (normopoetische und megaloblastische Kultur) als auch der Retikulozyten (normopoetische Kultur).

Die Ergebnisse werden diskutiert. Auf Grund von Zahl und statistischer Heterogenität der untersuchten Knochenmarkkulturen kann aus den Ergebnissen keine allgemeine Aussage abgeleitet werden.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1) BEGEMANN, H., : Klinische Hämatologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1970): a) S. 35 - 37 b) S. 64.

2) BEGEMANN, H., HARWERTH, H.-G. : Praktische Hämatologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1971): a) S. 295 - 296 b) S. 252 - 257.

3) BELITZ, H.J. : Die Anwendung statistischer Methoden in der Biologie. Der Mathematikunterricht, Ernst Klett Verlag Stuttgart, 3 : 83-103 (1960).

4) BESSIS, M., BRETON-GORIUS, J. : Le cycle du fer dans l'organisme révélé par le microscope électronique. Ann. Méd., 8 : 829 - 850 (1957).

5) BESSIS, M., BRETON-GORIUS, J. : L'ilôt érythroblastique et la rhophéocytose dans l'anémie ferriprive. Rev. Hémat., 15 : 233 - 240 (1960).

6) BESSIS, M.C., JENSEN, W.N. : Sideroblastic anaemia, mitochondria and erythroblastic iron. Symposion. Brit. J. Haemat., 11 : 49 (1965).

7) BILGER, R. : Die Siderozyten. In: Handbuch der gesamten Hämatologie. Verlag Urban und Schwarzenberg München-Berlin-Wien, 1 : 238 - 244 (1957).

8) BOLL, I. : Morphologische Studien zum Verhalten von Knochenmarkzellen in vitro. I. Granuloblastenmitosen. Folia haemat. N.F., 3 : 58 ff. (1958).

9) BOLL, I., FUCHS, G. : Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kultivierung von menschlichem Knochenmark in vitro. Blut, VII: 257 - 272 (1961).

10) BOLL, I. : Granulocytopoese unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Experimentelle Medizin, Pathologie und Klinik. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 17 (1966): a) S. 2-8 b) S. 119-126.

11) BOLL, I., MERSCH, G. : Morphologische Untersuchungen zur Proliferationskinetik der normalen und pathologischen Erythropoese in vitro. Blut, XVII: 193 - 214 (1968).

12) BROWN, E.B., MOORE, M. : Der Eisenstoffwechsel. Documenta Geigy, Acta clinica, 7: 12 - 34 (1967).

13) DEISS, A., KURTH, D., CARTWRIGHT, G.E., WINTROBE, M.M. : Experimental production of siderocytes. J. clin. Invest., 45: 353-364 (1966).

14) FREIREICH, E.J., MILLER, A., EMERSON, CH. P., ROSS, J.F. : The effect of inflammation on the utilisation of erythrocyte and transferrin bound radioiron for red cell production. Blood, XII: 972 - 982 (1957).

15) HECKNER, F. : Leitfaden der Blutzellkunde. Verlag Urban und Schwarzenberg. München-Berlin (1965): S. 20-28.

16) KAECHELE, E. : Die orale Behandlung von Anämien im höheren Lebensalter. Dtsch. med. J., 11: 366-367(1963).

17) KNEIFEL, P. : Verteilung und Gehalt von Eisengranula in Sideroblasten und Siderozyten in der Knochenmarkkultur bei der Berliner-Blau-Reaktion. Med. Diss. Freie Universität Berlin (1970).

18) KURTH, D., DEISS, A., CARTWRIGHT, G.E. : Circulating siderocytes in human subjects. Blood, 34: 754 - 764 (1969).

19) MYHRE, E. : Iron uptake by human erythroid cells in vitro. Scand. J. clin. Lab. Invest., 16: 201-211 (1964).

20) MYHRE, E. : Iron uptake and hemoglobin synthesis by human erythroid cells in vitro. Scand. J. clin. Lab. Invest., 16: 212 - 220 (1964).

21) RINGELHANN, B., LAUB, M. : Über die chronische Eisenmangelkrankheit auf Grund mehrjähriger Beobachtungen bei 154 Kranken. Acta med. Acad. Sci. hung., XX: 263-278 (1964).

22) STOBBE, H. : Hämatologischer Atlas. Akademie-Verlag Berlin (1970): S. 10 - 44.

23) WÖHLER, F. : Zur Bedeutung des Ferritins für den Eisenstoffwechsel. Acta hepat., 5: 2 - 15 (1957)

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie EURATOM - GSF Nr. 031-64-1 BIAD.

Die Arbeit wurde durch die DFG unterstützt.

DANKSAGUNG

Für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für das unermüdliche fördernd kritische Interesse an ihrem Fortgang sage ich Frau Prof. Dr. I. Boll herzlichen Dank. Ich danke allen Mitarbeitern des hämatologischen Labors für ihre aktive Hilfe und nicht zuletzt Herrn Prof. Dr. H. J. Belitz für seine freundliche Unterstützung bei der statistischen Berechnung.

LEBENSLAUF

24.8.1940	Als zweiter Sohn des Studienassessors Günter Werner und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Kulms in Kassel geboren.
1941	Vater gefallen.
1946 - 1949	Volksschule Niedenstein, anschließend Freie Waldorfschule Kassel.
1959	Mutter an Krebs gestorben.
25.3.1960	Abitur Freie Waldorfschule Kassel.
1960 - 1965	Studium an der Nordwestdeutschen Musikakademie Detmold, Hauptfach Oboe, Prof. H. Winschermann.
1964 - 1967	Tätigkeit als Solo-Oboist der Nordwestdeutschen Philharmonie Herford.
WS 1967	Beginn Medizinstudium an der FU Berlin aus freiem Entschluß.
1970	Physikum.
20.8.1973	Staatsexamen.